

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene
Geschäftsführender Direktor : Prof. Dr. Michael Lohoff

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Struktur-Funktions-Analysen von IRF4 in der T-Zelldifferenzierung

Inaugural-dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Cholho Kang

aus Pjöngjang

Marburg, 2016

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am
20.05.2016

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Helmut Schäfer

Referent: Prof. Dr. Michael Lohoff

Korreferent: Prof.Dr. Markus Schnare

zur Entwicklung
meiner Heimat
und
für Wohlfühlen
meines Volkes

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VI
Zusammenfassung	IX
Summary.....	XI

1 Einleitung.....	1
1.1 Vorbemerkungen	1
1.2 Differenzierung der Th-Zellsubpopulationen und ihre Rolle in Immunerkrankungen	3
1.2.1 Differenzierung der Th-Zellsubpopulationen	3
1.2.1.1 Th1-Zellen	3
1.2.1.2 Th2-Zellen	5
1.2.1.3 Th9-Zellen	7
1.2.1.4 Th17-Zellen	10
1.2.2 Beispiele für durch Th-Zellen vermittelte Krankheiten	13
1.2.2.1 Multiple Sklerose (MS)	13
1.2.2.2 Das allergische Asthma bronchiale	14
1.2.2.3 IBD (inflammatory bowel disease).....	16
1.3 Der Transkriptionsfaktor - IRF4	17
1.3.1 Transkriptionsfaktoren	17
1.3.2 IRF-Familie	17
1.3.3 IRF4.....	19
1.3.3.1 Die Struktur von IRF4	19
1.3.3.2 Die Funktion von IRF4.....	20
1.3.3.2.1 Wechselwirkung mit anderen Transkriptionsfaktoren.....	20
1.3.3.2.1.1 <i>PU.1</i>	20
1.3.3.2.1.2 <i>BATF-JUN Proteine</i>	21
1.3.3.2.1.3 <i>NFAT (nuclear factor of activated T-cells)</i>	22
1.3.3.2.1.4 <i>SMAD</i>	22
1.3.3.2.1.5 <i>Sonstige Transkriptionsfaktoren, die mit IRF4 in Wechselwirkung stehen</i>	22
1.3.3.2.2 Funktionen von IRF4 bei der Zelldifferenzierung im	

adaptiven Immunsystem	23
1.3.3.2.2.1 <i>CD8⁺T-Zelldifferenzierung</i>	23
1.3.3.2.2.2 <i>CD4⁺T-Zelldifferenzierung</i>	24
1.3.3.2.2.3 <i>B-Zellen</i>	25
1.3.3.2.2.4 <i>IRF4 als Onkogen oder Tumorsuppressor</i>	26
1.4 Zielsetzung der Arbeit	27
2 Material	29
2.1 Mäusestämme	29
2.2 Plasmide und Vektoren	29
2.2.1 pMIG-IRF4	29
2.2.2 pCGP und pEco	30
2.3 Bakterienklonierungsstamm	30
2.4 HEK-Zellen	30
2.5 Geräte und Laborzubehör	30
2.6 Chemikalien und Biochemikalien	32
2.7 Medien und Puffer	33
2.7.1 LB (<i>Luria-Bertani</i>)-Flüssig-Medium	33
2.7.2 LB (<i>Luria-Bertani</i>)-Agar-Festmedium	33
2.7.3 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	34
2.7.4 PBS (Phosphate Buffered Saline) - Puffer	34
2.7.5 FCS (fetal calf serum)	34
2.7.6 RPMI-1640 Medium	34
2.7.7 BSS (Balanced Salt Solution)	35
2.7.8 Saponin Puffer	35
2.7.9 MACS Puffer	35
2.7.10 2×HBS Puffer	35
2.7.11 Puffer für Western Blot	35
2.7.12 Puffer für ELISA	36
2.8 Primer	36
2.9 Kits	38
2.10 Antikörper, Zytokine und Fluoreszenzfarbstoffe	38

3 Methoden	40
3.1 Molekularbiologische Methoden	40
3.1.1 Mutagenese mittels Quikchange® II Site Directed Mutagenesis Kit ...	40
3.1.2 Herstellung der chemisch kompetenten <i>E.coli</i> Zellen.....	41
3.1.3 Hitze-Schock-Transformation.....	41
3.1.4 Stammkultur Konservierung	42
3.1.5 DNA Isolierung	42
3.1.6 Konzentrationsbestimmung von RNA und DNA	43
3.1.7 DNA Sequenzierung	43
3.1.8 qPCR	43
3.1.8.1 Isolierung der mRNA-Proben.....	43
3.1.8.2 cDNA Synthese	44
3.1.8.3 PCR und Dateiauswertung.....	44
3.1.9 Western Blot.....	46
3.1.9.1 Herstellung von Proteinlysaten und Bestimmung der Proteinkonzentration.....	46
3.1.9.2 Herstellung des SDS - Polyacrylamidgels.....	46
3.1.9.3 Gelelektrophorese.....	47
3.1.9.4 Western Blot.....	47
3.1.9.5 Detektion und Visualisierung der Proteine.....	48
3.1.10 ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay).....	48
3.2 Zellbiologische Methoden	50
3.2.1 Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer.....	50
3.2.2 Generierung von Virenüberständen mittels HEK (<i>human embryonic kidney</i>)-Zellen.....	50
3.2.2.1 Kultivierung und Umsetzen der HEK-Zellen.....	51
3.2.2.2 Transfektion von HEK-Zellen mit der Kalziumphosphat-Methode.....	51
3.2.3 Aufreinigung von CD4 ⁺ /CD8 ⁺ T-Zellen	52
3.2.4 Aufreinigung von naiven Th-/Tc-Zellen.....	53
3.2.4.1 Aufreinigung von naiven Th-Zellen	53
3.2.4.2 Aufreinigung von naiven Tc-Zellen	54
3.2.5 Differenzierung und retrovirale Transduktion von Th/Tc-Zellen	54

3.2.6	Unspezifische Stimulation von Th/Tc-Zellen	55
3.2.7	Oberflächenfärbung und intrazelluläre Färbung	56
3.2.8	Durchflusszytometrische Analyse und Zellsortierung	57
3.3	Statistische Analyse	60
4	Ergebnisse	61
4.1	Generierung von IRF4-Mutanten und deren Überexpression mit Hilfe von Retroviren	61
4.1.1	Primerdesign und Generierung der IRF4-Mutanten.....	61
4.1.2	Überexpression der Mutanten in murinen T-Zellen	64
4.2	Kinetik der Differenzierung der T-Zellsubpopulationen	65
4.3	Untersuchung der Funktionen von IRF4-Mutanten bei der T-Zelldifferenzierung	68
4.3.1	Die Mutante d421-450	68
4.3.1.1	Die Mutante d421-450 verstärkt die Th-Zelldifferenzierung	69
4.3.1.1.1	Die Mutante d421-450 erhöht die Zytokinproduktion in Th-Zellen	69
4.3.1.1.1.1	<i>FACS-Analyse der Zytokinproduktion</i>	69
4.3.1.1.1.2	<i>ELISA-Analyse der Zytokinproduktion</i>	71
4.3.1.1.2	Die Mutante d421-450 steigert die CCR6-Expression in Th17-Zellen	75
4.3.1.1.3	Die Mutante d421-450 steigert die ROR γ t-Expression in Th17-Zellen	76
4.3.1.2	Die Mutante d421-450 verstärkt die Tc17-Zelldifferenzierung ...	78
4.3.1.3	Proteinexpression durch pIRF4 und seine Mutanten.....	81
4.3.1.4	Die autoinhibitorische Domäne alleine inhibiert nicht die Th-Zelldifferenzierungen	82
4.3.2	Analyse der Mutanten P411-412 und P411-413	83
4.3.2.1	Die Mutante P411-412 führt zu reduzierter Th9- und Th17-Differenzierung.....	84
4.3.2.1.1	Die Mutante P411-412 führt zu reduzierter Zytokinproduktion in Th9- und Th17- Zellen	84
4.3.2.1.2	Die Mutante P411-412 führt zu reduzierter CCR6-Expression in Th17-Zellen.....	87

4.3.2.2 Die Mutante P411-412 vermittelt eine reduzierte Tc - Differenzierung.....	88
4.3.3 Einfluss verschiedener Mutanten im Bereich von aa 411-420 auf die Differenzierung von Th2-/Th9-/Th17- Zellen.....	91
5 Diskussion.....	94
6 Literaturverzeichnis	101
7 Publikationen	116
8 Lebenslauf	117
9 Verzeichnis der akademischen Lehrer.....	118
10 Ehrenwörtliche Erklärung.....	119
11 Danksagung	120

Abkürzungsverzeichnis

* In dieser Arbeit wurden englische Fachbegriffe sowie Bakterienstämme und Gannamen kursiv geschrieben.

aa ; amino acid

AHR ; airway hyper responsiveness

AhR ; Aryl hydrocarbon receptor

AICEs ; AP-1-IRF composite elements

AID : activation induced cytidine deaminase

AP ; activator protein

APC ; Antigen presenting cell

Arg ; Arginine

Asp ; Aspartic acid

BATF ; basic leucine zipper transcription factor, ATF like

BCL ; B cell lymphoma

Blimp ; B lymphocyte induced maturation protein

CCR ; C-C chemokine receptor

CD ; cluster of differentiation

CD ; crohn's disease

CLL ; chronic lymphoid leukemia

CML ; chronic myeloid leukemia

CXCL ; chemokine (C-X-C motif) ligand

DBD ; DNA binding domain

DC ; dendritic cell

DLBCL ; diffuse large B-cell lymphoma

EAE ; experimental autoimmune encephalomyelitis

EICEs ; ETS-IRF composite elements

EMSA ; electrophoretic mobility shift assay

EOMES ; eomesodermin

ETS ; E26 transformation specific family

Fox ; forkhead box

GATA3 ; GATA binding protein 3

GM-CSF ; Granulocyte macrophage colony-stimulating factor

His ; Histidine

HTH ; helix-turn-helix

HTLV ; human T-cell lymphotropic virus

IAD ; IRF association domain

IBD ; inflammatory bowel disease

ID ; inhibitor of DNA binding protein

IFN ; Interferon

Ig ; Immunoglobulin

Ikb ; nuclear Ikb family member

IL ; Interleukin

IRF ; Interferon regulatory factor

ISRE ; interferon sensitive response element

JAK ; Janus kinase

kb ; kilobase

kD ; kilodalton

LCMV ; lymphocyte choriomeningitis virus

Leu ; leucine

LPL ; lymphoplasmacytic lymphoma

LT ; lymphotoxin

Lys ; lysine

MH ; mad-homology

MHC ; Major histocompatibility complex

MM ; multiple myeloma

mRNA ; messenger RNA

MS ; multiple sclerosis

MUM ; multiple myeloma oncogene

NFAT ; nuclear factor of activated T cells

OVA ; ovalbumin

PEST ; rich in proline, glutamic acid, serine, and threonine

PRR ; pattern recognition receptor

PU.1 ; purine-rich nucleic acid binding protein 1

R ; receptor

RD ; regulatory domain

ROR ; RAR-related orphan receptor

Ser ; Serine

siRNA ; small interfering RNA

SMAD ; Sma and Mad related protein

STATs ; Signal transducers and activators of transcription

T-bet ; T-box protein expressed in T cells

TCR ; T cell receptor

Tfh ; T follicular helper

TGF ; transforming growth factor

Th ; T helper

TNF ; Tumor necrosis factor

Treg ; T regulatory

TSLP ; thymic stromal lymphopoietin

UC ; ulcerative colitis

Val ; valine

WT ; wild type

Zusammenfassung

Der hämatopoietische Transkriptionsfaktor Interferon regulatorischer Faktor (IRF) 4 reguliert die Entwicklung und Funktion der T-, B- und dendritischen Zellen des Immunsystems. Im T-Zell-Kompartiment beeinflusst dieser Faktor die Differenzierungen von Vorläuferzellen zu den Th/c2-, Th/c9- und Th/c17- Zell-Subtypen, welche neben ihren vielfältigen Aufgaben im Immunsystem auch zu schweren Autoimmunerkrankungen wie Multipler Sklerose und chronischer Darmentzündung und zu Asthma führen können. IRF4 bindet per se schwach an Promotoren und für seine Funktion ist die Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren erforderlich. Nach Interaktion mit den Partnern wird nämlich die Wirkung seiner autoinhibitorischen Domäne in der C-terminalen Region aufgehoben, welche sonst die Bindung seiner DBD an den Promotor verhindert.

Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigt sich daher mit der Frage, ob die autoinhibitorische Domäne die biologische Wirkung von IRF4 auf T-Zelldifferenzierungen beeinflusst. Hierfür wurde die Deletionsmutante (d421-450), der selektiv die autoinhibitorische Domäne fehlt, kloniert, in IRF4 defizienten T-Zellen überexprimiert und ihr Effekt auf T-Zelldifferenzierungen mit dem von vollständigem IRF4 verglichen. Die Mutante d421-450 verstärkte die Th/c-Zelldifferenzierung (besonderes die Th/c17-Zelldifferenzierung), was durch gesteigerte Subtypenspezifische Zytokinproduktion und Expression der Chemokinrezeptoren und Mastertranskriptionsfaktoren charakterisiert wurde. Die Mutante d411-450, welcher neben der autoinhibitorischen Domäne noch die 10 davor angeordneten aa 411-420 fehlen, hat dagegen sämtliche Aktivität verloren. Das bestätigt, dass (1) die autoinhibitorische Domäne auf die T-Zelldifferenzierungen hemmend wirkt und (2) die 10 aa vor der autoinhibitorischen Domäne für die T-Zelldifferenzierungen wichtig sind. Das stellt den ersten Befund über den biologischen Effekt der autoinhibitorischen Domäne von IRF4 auf die T-Zelldifferenzierungen dar.

IRF4 hat eine modulare Domänenstruktur, wobei die DBD für die Bindung an den Promotor zuständig ist, während die RD die Wechselwirkung mit anderen Transkriptionsfaktoren vermittelt. Diese findet Partner-abhängig an unterschiedlichen Stellen innerhalb der RD statt. Dabei sind die aa 411-420 nicht nur wichtig für die Differenzierungen der Th/c2-, Th/c9- und Th/c17-Zellsubpopulationen (wie im ersten

Teil gezeigt), sondern auch für die Wechselwirkung mit den Transkriptionsfaktoren PU.1 und NFATc2. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde daher detailliert untersucht, wie die Modifikation dieser Region zum Verlust der Aktivität bei der T-Zelldifferenzierung führen kann. Dabei wurde gefunden, dass durch die Prolin-Austauschmutante P411-412 bevorzugt die Th/c9- und Th/c17- Differenzierungen unterbunden und durch P411-413 alle untersuchten T-Zelldifferenzierungen verhindert wurden. Wir gehen davon aus, dass die Prolinmutanten dazu beitragen, die Bildung einer α -Helixstruktur der Peptidkette in diesem Bereich zu zerstören. Im zweiten Teil dieser Arbeit konnte damit erstmals erfolgreich gezeigt werden, dass die aa 411-412 von IRF4 essentiell für die Th/c9- und Th/c17-Zelldifferenzierung sind.

Summary

The hematopoietic transcription factor interferon regulatory factor (IRF) 4 regulates the development and function of T, B and dendritic cells of the immune system. Within the T-cell compartment, this factor directs the differentiation of common precursor cells to the Th/c2, Th/c9 and Th/c17 cell subsets, which, apart from their multiple physiological functions, can cause severe autoimmune diseases like multiple sclerosis, inflammatory bowel disease and also asthma. On its own, IRF4 binds weakly to promoters. In order to function, it needs the interaction with other partner transcription factors, which override the effect of an autoinhibitory domain at the C-terminal region of IRF4 that prevents the binding of its DBD at the promoter.

Therefore, the first part of this work deals with the question, whether the autoinhibitory domain affects the biological activity of IRF4 on T cell differentiation. For this, the IRF4 deletion mutant (d421-450) which selectively lacks the autoinhibitory domain, was cloned, overexpressed in IRF4 deficient T cells and compared in its effect on T cell differentiation with total IRF4. As characterized by subset-specific cytokine production and expression of chemokine receptors and master transcription factors, the mutant d421-450 enhanced overall Th/c-cell differentiation and in particular Th/c17-cell differentiation. In contrast, the mutant d411-450 which in addition lacks the 10 aa located upstream of the autoinhibitory domain, lost all examined activity during T - cell differentiation. These findings confirm that (1) the autoinhibitory domain has an inhibitory effect on T-cell differentiation, and (2) the 10 aa upstream of the autoinhibitory domain are important for T-cell differentiation. This is the first report of the biological effect of the autoinhibitory domain on T cell differentiation.

IRF4 has a modular domain structure, in which the DBD is responsible for binding to the promoter, while the RD mediates the interaction with other transcription factors. Dependent on the respective partner, this interaction occurs at different positions within the RD. In this regard, aa 411-420 are not only involved in the differentiation of the Th/c2, Th/c9 and Th/c17-cell subsets (as shown in the first part), but are also important for the interaction with the transcription factors PU.1 and NFATc2. In the second part of this work, it was therefore analysed in detail, how the modification of this region affects the capacity to regulate T-cell differentiation. It was found that the proline exchange mutant P411-412 mainly inhibited Th/c9 and Th/c17 differentiation, while the

Summary

P411-413 mutant totally lost activity in all studied T cell differentiation conditions. We hypothesize that the proline substitutions help to destroy the formation of an α -helical structure of the peptide chain in this region. Thus, in the second part of this work it has been successfully demonstrated for the first time that the aa 411-412 of IRF4 are essential for Th/c9 and Th/c17-cell differentiation.

1 Einleitung

1.1 Vorbemerkungen

Die Immunologie ist die Wissenschaft der Selbst- und Fremderkennung von Zellen und löslichen Substanzen in vitalen Organismen und den daraus folgenden Prinzipien der Immunabwehr. Es gibt zwei grundlegend verschiedene Mechanismen der Immunabwehr, je nachdem, ob diese angeboren und daher erregerspezifisch, oder ob diese erworben und daher erregerspezifisch ist. Diese zwei Abwehrfunktionen sind durch zwei Unterabteilungen des Immunsystems gewährleistet, die sich ergänzen.

Die „angeborene Immunabwehr“ entsteht durch die Zusammenwirkung der Bestandteile des angeborenen Immunsystems und bildet die vorderste Front der Abwehr gegen Krankheitserreger. Dazu zählen anatomische und physiologische Barrieren wie Epithelien, aber auch zellvermittelte Immunreaktionen durch Phagozytose, sowie allgemein entzündliche Reaktionen und das Komplementsystem. Die angeborene Immunantwort findet innerhalb von Minuten statt und ist durch die Erbinformation lebenslang festgelegt.

Das erworbene Immunsystem stellt eine zweite effektive Abwehr zur Verfügung, falls es der ersten Verteidigungslinie des Körpers durch das angeborene Immunsystem nicht gelingt, die Erreger zu vernichten. Das erworbene Immunsystem unterscheidet sich von dem Angeborenen durch die Spezifität und das Gedächtnis. Die Spezifität des erworbenen Immunsystems beruht darauf, dass die individuellen erworbenen Immunzellen Rezeptoren einer einzigen Spezifität tragen, die sich von denjenigen aller anderen Klone unterscheiden. Die dafür benötigte Vielfalt an Rezeptoren wird durch einen genetischen Mechanismus erreicht, der während der Entwicklung dieser Zellen abläuft und als Antwort auf ein Antigen stattfindet.

Die erworbene Immunabwehr unterteilt sich wiederum in die zellvermittelte und humorale Immunabwehr. Die Hauptakteure der humoralen Immunantwort sind die Antikörper, die in Form von Zellrezeptoren auf den B-Lymphozyten exprimiert werden. B-Lymphozyten erkennen mit diesen Rezeptoren Antigen 3-dimensional in intakter Form, werden mit Hilfe der Th- (*T helper*) Zellen (s.u.) aktiviert und differenzieren sich zu Plasmazellen, die eine lösliche Variante ihrer Zellrezeptoren als Antikörper sezernieren. Für Keime außerhalb von Zellen, also im Blut und in Körperflüssigkeiten,

werden Antikörper bereitgestellt. Bei Erregern, die sich innerhalb von Gewebszellen befinden, ist dagegen eine zellvermittelte Immunantwort nötig, um diese zu entfernen.

Die Hauptakteure der zellvermittelten Immunantwort sind die im Thymus herangereiften T-Lymphozyten. Diese tragen auf ihrer Oberfläche TCRs (*T cell receptors*), die für einen T-Zellklon einzigartig sind und sich von den anderen T-Zellklonen unterscheiden. TCRs binden jeweils ein Antigenfragment, was ihnen von den APCs (*antigen presenting cells*) in Form von Peptiden über die Moleküle des MHC (*major histocompatibility complex*) präsentiert wird. Diese Bindung gilt als erstes Signal für die Aktivierung und weitere Differenzierung der naiven T-Zellen zu Effektor-/Gedächtniszellen. Für eine optimale Aktivierung brauchen T-Zellen zusätzlich costimulatorische Signale, die über die Interaktion von konstanten Molekülen auf T-Zellen (z.B. CD (*cluster of differentiation*) 28) mit ihren Partnermolekülen (z.B. B7/1, B7/2) auf APC gewährleistet werden. Fehlen diese costimulatorischen Signale, kommt es zu unvollständiger T-Zell-Aktivierung oder zu einem Stadium von T-Zell-Anergie.

T-Lymphozyten lassen sich aufgrund des TCR, den sie tragen, in 2 Klassen unterteilen, solche mit einem TCR aus einer α - und einer β -Untereinheit und solche mit einem Rezeptor aus einer γ - und einer δ -Untereinheit (Brenner et al., 1986; Lew et al., 1986). Die letztere Klasse macht ca. 0,5–10% der humanen peripheren Blut-Lymphozyten aus und kommt in Darmschleimhäuten in großer Zahl vor.

Reife T-Lymphozyten lassen sich auch aufgrund ihrer Oberflächenmoleküle in CD4-tragende ($CD4^{+}$ -) und in CD8-tragende ($CD8^{+}$ -) T-Lymphozyten unterteilen. $CD4^{+}$ T-Lymphozyten erkennen das Antigen als Komplex mit den MHC-Molekülen der Klasse II, $CD8^{+}$ T-Lymphozyten als Komplex mit den MHC-Klasse-I-Molekülen. $CD8^{+}$ T-Lymphozyten sind darauf spezialisiert, infizierte oder maligne Zellen direkt abzutöten und werden daher zytotoxische Lymphozyten genannt. Aufgabe der $CD4^{+}$ T-Lymphozyten ist es, andere Immunzellen bei deren Aktivierung, Differenzierung und Rekrutierung zu beeinflussen, zumeist durch die Ausschüttung von verschiedenen Zytokinen. Aufgrund solcher Wirkung nennt man diese T-Lymphozyten Th-Zellen.

1.2 Differenzierung der Th-Zellsubpopulationen und ihre Rolle in Immunerkrankungen

1.2.1 Differenzierung der Th-Zellsubpopulationen

Naive $CD4^+$ T-Zellen differenzieren sich zu verschiedenen T-Effektorzellen weiter, die vielfältige Funktionen aufweisen. Die bisher wichtigsten bekannten Subpopulationen der Th-Effektorzellen sind die Th1-, Th2-, Th9-, Th17-, Th22- und Tfh- (*T follicular helper*) Zellen, sowie Treg- (*T regulatory*) Zellen. Diese Untergruppen werden vorwiegend aufgrund der unterschiedlichen Zytokine definiert, die die Zellen jeweils freisetzen; dies gilt besonders für die Th1-, Th2-, Th9-, Th17- und Th22-Zellen.

Die zur Differenzierung der verschiedenen Th-Zellsubpopulationen erforderlichen Signale umfassen antigenspezifische-, costimulatorische- und Zytokinsignale, wobei die ersten beiden Signale von APC angeboten werden und für alle Th-Zelltypen gemeinsam sind.

Das Zytokinmilieu, das die naiven Th-Zellen bei dieser ersten Antigenerkennung umgibt, bestimmt den weiteren Differenzierungsweg der Th-Zellen in die verschiedenen Subpopulationen. Zusätzlich gibt es für alle Th-Zellsubpopulationen spezifische Transkriptionsfaktoren, die neu exprimiert werden und für die Entstehung und/oder Funktion der jeweiligen Subpopulation entscheidend sind.

1.2.1.1 Th1-Zellen

Th1-Zellen besitzen eine wichtige Rolle in der Regulation von entzündlichen Prozessen sowie in der Abwehr der intrazellulären Bakterien, Viren und *Protozoa*. Th1-Zellen entstehen aus naiven Th-Zellen unter der Einwirkung von IL (*Interleukin*) -12 und IFN (*Interferon*) - γ , die von den Zellen des angeborenen Immunsystems produziert werden (Seder et al., 1993). Diese Zytokine stimulieren in den naiven Th-Zellen durch die Rezeptorbindung intrazelluläre JAK-STATs (*janus kinase signal transducers and activators of transcription*) Signalwege, die ihrerseits zur Aktivierung von Th1-spezifischen Genen führen.

Die Subpopulation-spezifischen Transkriptionsfaktoren der Th1-Zellen sind STAT1 (Afkarian et al., 2002), STAT4 (Thierfelder et al., 1996) und T-bet (*T-box protein expressed in T cells*) (Szabo et al., 2000). Die Bindung von IFN- γ an den IFN- γ -Rezeptor löst zunächst die Aktivierung von STAT1 aus, das wiederum die Expression des Transkriptionsfaktors T-bet aktiviert (Szabo et al., 2000). T-bet induziert die Expression von IFN- γ und setzt ebenfalls die Expression der β 2-Signaluntereinheit des IL-12 Rezeptors in Gang (Afkarian et al., 2002). Dies ermöglicht die Bindung des Zytokins IL-12 an diesen Rezeptor und im weiteren Schritt wird STAT4 aktiviert, was die Vermehrung und Differenzierung der Th1-Zellen stimuliert (Thieu et al., 2008). T-bet hemmt außerdem GATA3 (*GATA binding protein 3*) (Hwang et al., 2005) und ROR (*RAR-related orphan receptor*) γ t (Lazarevic et al., 2011), welches die spezifischen Transkriptionsfaktoren von Th2- bzw. Th17-Zellen sind (s.u.), und blockiert damit deren Differenzierung.

Th1-Effektorzellen sezernieren die Zytokine IL-2, IFN- γ und TNF (*tumor necrosis factor*) - α (Mosmann and Coffman, 1989).

Th1-Zellen besitzen eine doppelte Funktion. Die erste besteht darin, bestimmte intrazelluläre bakterielle und parasitäre Infektionen, die über Phagozytose durch Makrophagen nicht beseitigt wurden, unter Kontrolle zu bringen. Durch Zellkontakte und die Sekretion von IFN- γ induzieren Th1-Zellen in den Makrophagen die Fusion der Lysosomen mit den Vesikeln, die die Erreger enthalten, und stimulieren die antimikrobiellen Mechanismen der Makrophagen.

Die zweite Funktion der Th1-Zellen besteht darin, als Helferzellen in B-Lymphozyten die bevorzugte Produktion von Antikörpern der Klasse Ig (*Immunoglobulin*) G2a anzuregen, indem sie costimulatorische Signale (v.a. IFN- γ) für antigenaktivierte naive B-Lymphozyten aussenden. IgG2a aktiviert das Komplementsystem und bindet Komplement C1q. Andererseits bindet IgG2a an Fc γ -Rezeptoren von Makrophagen und NK-Zellen und induziert die antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität effektiver als die anderen Antikörper. Daher sind die Th1-Zellen auch in dieser indirekten Weise in der Lage, Infektionen zu bekämpfen.

Th1-Zellen haben außerdem noch die wichtige Aufgabe, Phagozyten zu den Infektionsherden zu locken. Zum einen stellen Th1-Zellen die hämatopoetischen Wachstumsfaktoren IL-3 und GM-CSF (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*) her, welche die Bildung neuer Phagozyten im Knochenmark stimulieren. Zum anderen produzieren Th1-Zellen im Entzündungsort TNF- α und LT (*lymphotoxin*) - α ,

welche die Oberflächeneigenschaften von Endothelzellen so verändern, dass Phagozyten an ihnen haften bleiben (Murphy et al., 2009). Außerdem werden während der Entzündungsreaktion Chemokine wie CXCL (*chemokine (C-X-C motif) ligand*)₂ von Th1-Zellen gebildet und steuern damit die Wanderung von Monozyten durch das Gefäßendothel in das entzündete Gewebe.

1.2.1.2 Th2-Zellen

Th2-Zellen unterstützen die humorale Immunantwort gegen extrazelluläre Parasiten, Bakterien und Toxine. Pathophysiologisch beteiligen sich Th2-Zellen auch in der Auslösung Allergischer Erkrankungen wie beispielsweise Asthma.

IL-4 ist das wichtigste Zytokin für die Th2-Zelldifferenzierung (Le Gros et al., 1990; Swain et al., 1990). Darüber hinaus tragen IL-2 (Cote-Sierra et al., 2004), IL-7 und TSLP (*thymic stromal lymphopoietin*) (Guo et al., 2009) zur Th2-Zelldifferenzierung bei, indem sie durch die Aktivierung von STAT5 die Transkription von IL-4 induzieren (Zhu et al., 2003). Kommen Antigen-aktivierte T-Zellen mit IL-4 in Kontakt, bindet IL-4 an den IL-4R (*receptor*), der aus der IL-4R α und der IL-2R γ Kette besteht, und führt so die Phosphorylierung von JAK1 und 3 herbei (Nelms et al., 1999; Witthuhn et al., 1994). JAK3 phosphoryliert dann STAT6, welches dimerisiert und in den Zellkern eintritt (Goenka and Kaplan, 2011; Kaplan et al., 1996). STAT6 wiederum induziert in dem Zellkern die Expression des Transkriptionsfaktors GATA3 (Ansel et al., 2006). Aber mehrere Studien deuten darauf hin, dass GATA3 auch STAT6-unabhängig induziert werden kann (Amsen et al., 2004; Tanigaki et al., 2004; Yamane et al., 2005). GATA3 (Zheng and Flavell, 1997), STAT5 (Zhu et al., 2003) und STAT6 (Kaplan et al., 1996; Takeda et al., 1996) sind unverzichtbare Transkriptionsfaktoren für die Entwicklung von Th2-Zellen, wobei GATA3 als Mastertranskriptionsfaktor für Th2-Zellen bekannt ist. GATA3 fördert einerseits die Produktion der Th2 Zytokine (IL-4, IL-5, IL-6 und IL-13) und induziert so die Th2-Zelldifferenzierung, andererseits unterdrückt es die Differenzierung von Th1-Zelllinien (Yagi et al., 2011). Dies geschieht, indem GATA3 mit der Expression von Th1/Th2 - Zielgene dem Transkriptionsfaktor T-bet entgegenwirkt (Jenner et al., 2009). Außerdem verstärkt GATA3 seine eigene Aktivität (Ouyang et al., 2000). Auf diese Weise löst GATA3 nicht nur die Differenzierung der Th2-Zellen aus, sondern erhält sie auch aufrecht. STAT6 ist ebenfalls ein wirksamer Aktivator für die Gene mehrerer Zytokine, deren

Produktion für Th2-Zellen charakteristisch ist, beispielsweise IL-4. STAT5 und GATA3 wirken ebenfalls in der Th2-Zelldifferenzierung mit (Zhu et al., 2003).

Des Weiteren wird IRF (*interferon regulatory factor*) 4 in Th2-Zellen exprimiert und ist für ihre Differenzierung und Funktion ebenfalls von entscheidender Bedeutung (Lohoff et al., 2002; Rengarajan et al., 2002). *Irf4*-defiziente (*Irf4*^{-/-}) Mäuse weisen Defekte in der Th2-Differenzierung auf, die mit einer verminderten GATA3-Expression und IL-4-Produktion einhergehen (Lohoff et al., 2002).

Wie erwähnt, umfasst das Zytokinprofil der Th2-Zellen hauptsächlich IL-4, IL-5, IL-6 und IL-13. Von Th2-Zellen gebildetes IL-4 wird durch seine hemmende Wirkung auf Makrophagen zu den anti-inflammatorischen Zytokinen gerechnet. Unter anderem verringert es die Produktion von IL-12 und damit die Differenzierung von Th1-Zellen sowie die Produktion von IFN- γ . Es ist somit wichtig für die Homöostase von Th1- und Th2-Immunantworten. IL-4 trägt zur IgE-vermittelten Immunantwort auf zwei Weisen bei. In den bereits aktivierten B-Zellen wirkt es entscheidend auf den in ihnen ablaufenden Antikörperklassenwechsel zu IgE, IgG1 und IgG4. Außerdem hochreguliert es die Expression von IgE-Rezeptoren: Niedrig-affinen IgE-Rezeptoren (Fc ϵ R2; CD23) in B-Zellen und Phagozyten und hoch-affinen IgE-Rezeptoren (Fc ϵ R1) in Mastzellen und Basophilen (Pawankar et al., 1997). Da die IgE-vermittelte Immunantwort bei der Abwehr von Parasiten, aber auch bei der Entstehung von hypersensitiven Reaktionen wie z.B. allergischem Asthma eine wichtige Rolle spielt (Bell, 1996), erklärt sich hieraus die Wirkung von IL-4 bei diesen Erkrankungen.

Neben dieser klassischen immunologischen Wirkung von IL-4 wurde für dieses Zytokin auch eine Hemmung der spontanen Apoptose von B - Zellen nachgewiesen (Wurster et al., 2002), sowie ein Schutz vor der Fas-vermittelten B-Zellapoptose (Nakanishi et al., 1996) bzw. Glukokortikoid-induzierten Apoptose festgestellt (Tamada et al., 1998).

IL-5 beschleunigt den Übergang von aktivierten B-Zellen zu antikörperproduzierenden Plasmazellen in Mäusen. Außerdem ist es als Wachstums-/Differenzierungsfaktor für Eosinophile bekannt (Kouro and Takatsu, 2009) und unterstützt damit die Abwehr von Parasiten.

IL-6 unterstützt die Entstehung von Th17-Zellen (siehe unten) und gilt damit als proinflammatorisches Interleukin, welches eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Autoimmunität und Entzündung spielt. Es wurde weiterhin bekannt, dass IL-6 durch die Blockierung der Apoptose der Zellen während der Entzündung dazu beiträgt, dass die Zellen der toxischen Situation lange ausgesetzt und damit in Richtung auf das

neoplastische Wachstum fortgeschritten sind (Hodge et al., 2005). Patienten mit metastasiertem Krebs im fortgeschrittenen Stadium haben einen höheren Spiegel von IL-6 im Blut, dessen Ursprung allerdings neben Th2-Zellen verschiedene andere Zelltypen umfasst, z.B. Monozyten, Makrophagen, Fibroblasten, Endothelzellen, B-Zellen und Tumorzellen (Kishimoto, 1989).

IL-13 bewirkt zusammen mit IL-4 den Isotypwechsel der B-Zellen zur Produktion von IgE, indem es ebenfalls den JAK-STAT Signalweg aktiviert.

1.2.1.3 Th9-Zellen

Man hat inzwischen weitere Differenzierungsprogramme der Th-Zellen entdeckt, z.B. das für IL-9-produzierende Th9-Zellen. Schmidt *et al.* haben zuerst diese Subpopulation von Th-Zellen in Mäusen nachgewiesen und die für die *in vitro* Entstehung von diesen Zellen unerlässlichen Zytokine definiert (Schmitt et al., 1994).

Die Differenzierung der Th9-Zellen ist von IL-4 und TGF (*transforming growth factor*)- β abhängig (Dardalhon et al., 2008; Veldhoen et al., 2008b). Diese beiden Zytokine steuern das Netzwerk der Transkriptionsfaktoren in naiven Th-Zellen, die die Transkription des *Il9*-Gens beeinflussen. Wie bei Th2-Zellen, aktiviert IL-4 auch hier die Transkriptionsfaktoren STAT6, GATA3 und IRF4 und dies wiederum steuert die Synthese von IL-9 (Dardalhon et al., 2008; Goswami et al., 2012; Staudt et al., 2010; Veldhoen et al., 2008b). Dabei aktiviert das IL-4-Signaling auch hier die Phosphorylierung von STAT6 (pSTAT6), gefolgt von der Homodimerisierung von pSTAT6, das in den Zellkern eintritt, wo die Transkription der Zielgene stattfindet (Goenka and Kaplan, 2011). pSTAT6 unterstützt dabei die Differenzierung von Th9-Zellen auf zwei Weisen.

Zum einen erhöht pSTAT6 die Transkription von *Il9* durch die direkte Bindung an den *Il9* Promotor (Yang et al., 2013) und darüber hinaus unterbindet es die Expression von TGF- β -induziertem Fox (*forkhead box*) P3 und dem Th1-assoziierten Transkriptionsfaktor T-bet, die ihrerseits jeweils die Produktion von IL-9 blockieren (Dardalhon et al., 2008; Goswami et al., 2012).

Wie oben bereits dargestellt, ist GATA3 ein weiterer Transkriptionsfaktor, der mit dem STAT6 Signalweg gekoppelt ist. Im Vergleich zu Th2-Zellen erzeugen Th9-Zellen eine geringere Expression von GATA3, aber die Expression von GATA3 ist dennoch auch für die Th9-Differenzierung wichtig. Dies wurde dadurch bewiesen, dass die Depletion

von GATA3 eine mangelnde Th9-Differenzierung zur Folge hatte (Dardalhon et al., 2008).

Obwohl IL-4 für die Differenzierung von Th9-Zellen wichtig ist, induziert es für sich allein kein Th9-orientiertes Programm. Die Umschaltung vom Th2-zum Th9-Programm ist bedingt durch die Kombination mit dem Zytokin TGF- β . Dieses entfaltet seine Funktion sowohl SMAD (*Sma and Mad related proteins*) -abhängig als auch -unabhängig (Derynck and Zhang, 2003). Zwei Forschungsgruppen belegten, dass SMAD 2,3 und 4 für die optimale Th9-Differenzierung notwendig sind (Tamiya et al., 2013; Wang et al., 2013). Die Blockierung von SMAD 2 und 4 führt eher zur Th2-Differenzierung, während die Th9-Differenzierung dadurch stark beeinträchtigt wird (Wang et al., 2013). SMAD 2/3 erhöht die IL9-Produktion, indem es mit dem IRF4 in Wechselwirkung tritt und das Chromatin am *Il9*-Gen so modifiziert, dass die Transkription von *Il9* beginnen kann (Tamiya et al., 2013). Zusätzlich zu den erwähnten Transkriptionsfaktoren ist daher IRF4 *in vitro* wie auch *in vivo* ebenfalls entscheidend für die Entstehung der Th9-Zellen (Staudt et al., 2010).

Dies ließ sich durch die Untersuchung von *Irf4*^{-/-}Mäusen oder durch siRNA (*small interfering RNA*) *Irf4*-knockdown Experimente zeigen (Staudt et al., 2010). Außerdem konnte die Überexpression von IRF4 in *Irf4*^{-/-}Mäusen die IL-9 Produktion wiederherstellen (Jabeen et al., 2013).

Ein anderer von TGF- β sowie dem T-Zellrezeptor-Signalweg kontrollierter Transkriptionsfaktor ist PU.1 (*purine-rich nucleic acid binding protein 1*), der zu den ETS (*E26 transformation specific family*) Transkriptionsfaktoren gehört (Chang et al., 2010). *Spi.1* (das für PU.1 kodierende Gen) - defiziente Th-Zellen weisen eine mangelhafte Produktion von IL-9 auf und neigen zur Freisetzung von Th2-Zytokinen, während die Überexpression von PU.1 sowohl in Th2- als auch in Th9-Zellen die IL-9-Produktion hervorruft. Wie andere Transkriptionsfaktoren bindet PU.1 direkt an den *Il9*-Promotor und erhöht wahrscheinlich die Transkription des *Il9*-Gens, indem es Histon-Modifikation (H3 Acetylation und H3K27 Methylation) auslöst und dadurch den Zugang anderer Transkriptionsfaktoren an den Promotor erleichtert (Chang et al., 2010). Durch ein Experiment, bei dem SMAD 2/4-defiziente und WT (*wild type*) Th-Zellen unter Th9-Differenzierungsbedingungen kultiviert wurden, ließ sich zeigen, dass die Expression von PU.1 SMAD 2/4 -unabhängig reguliert wird und PU.1 die Th9-Zelldifferenzierung unabhängig vom TGF- β – SMAD Signaling induziert (Wang et al., 2013).

Zusammenfassend aktivieren die Th9-Primingzytokine IL-4 und TGF- β mehrere durch ihren Signalweg kontrollierte Transkriptionsfaktoren, die entweder direkt am *Il9*-Promotor binden, oder in Wechselwirkung mit anderen Faktoren die *Il9*-Transkription beschleunigen, und dadurch die Th9-Polarisation erzielen.

Neben IL-4 und TGF- β beeinflussen auch andere durch Zytokine vermittelte Signalwege die Th9-Differenzierung. Ein wichtiger solcher Weg ist erneut (wie bei Th2-Zellen) der STAT5-Signalweg, den das Zytokin IL-2 auslöst. *Il2*^{-/-}Th-Zellen waren nicht in der Lage, IL-9 als Reaktion auf IL-4 und TGF- β zu produzieren, aber sie konnten mit der IL-9 Produktion beginnen, sobald IL-2 zur Kultur zugegeben wurde (Liao et al., 2014; Schmitt et al., 1994). Es wurde entsprechend festgestellt, dass auch *Stat5*^{-/-}Mäuse eine dramatische Senkung in der IL-9 Produktion aufwiesen, da es sich ja bei STAT5 um einen Transkriptionsfaktor des IL-2 Signalweges handelt (Liao et al., 2014). Dies wird wiederum durch ein kürzlich beschriebenes Experiment bestätigt, bei dem die Wirkung von STAT5 in naiven CD4⁺T-Zellen durch einen STAT5 Inhibitor oder über inhibitorische *siSTAT5* RNA blockiert wurde und wo dann keine IL-9 Produktion unter Th9-Differenzierungsbedingungen mehr zustande kam (Bassil et al., 2014).

Der IL-2-STAT5 Signalweg steuert die Th9-Differenzierung durch mehrere Mechanismen, wobei ersterer die direkte Bindung an den *Il9*-Promotor ist. Das wurde anhand eines Luciferase-Reporter Experiments nachgewiesen (Bassil et al., 2014). Neben der direkten Bindung erhöht das IL-2-STAT5-Signal die Expression anderer IL-9-fördernder Transkriptionsfaktoren, nämlich von IRF4 und PU.1 (Chang et al., 2010; Jabeen et al., 2013; Staudt et al., 2010).

Neben STAT5 steuert auch STAT1, das Teil der Signalwege mehrerer Zytokine ist, das Th9-Zelldifferenzierungsprogramm - allerdings negativ. Dabei gehören IFN- γ , Typ I IFNs, IL-6, IL-10, IL-21 und IL-27 zu den Zytokinen, die via STAT1 die Th9-Differenzierung supprimieren. Die Aktivierung von STAT1, etwa durch IFN- γ , führt im Gegensatz zu STAT5 in Th9-polarisierten CD4⁺T-Zellen zur Reduktion der IL-9-Produktion, weil IFN- γ den Effekt von IL-4 neutralisiert (Schmitt et al., 1994).

In einem Asthmamodell, in dem das Gen *Tyk2* fehlt, das in der Typ I IFN Signalkaskade und STAT1/3 Aktivierung beteiligt ist, konnte daher eine erhöhte IL-9 Produktion beobachtet werden (Ubel et al., 2014). Eine Studie in der EAE (*experimental autoimmune encephalomyelitis*), dem Modell für die Multiple Sklerose, bewies, dass IFN- γ in DCs (*dendritic cells*) STAT1- und T-bet-abhängig die Produktion von IL-27

herbeiführte und dies wiederum die Th9-Differenzierung sowohl *in vivo* als auch *in vitro* supprimierte (Murugaiyan et al., 2012).

1.2.1.4 Th17-Zellen

Bei Th17-Zellen handelt es sich um einen das linienspezifische Zytokin IL-17 produzierenden Th-Zellsubtyp. Diese Zellpopulation wurde 2006 als neuer Th-Zellsubtyp definiert, als man linienspezifische einzigartige Zytokine und Transkriptionsfaktoren fand, die zu ihrer Differenzierung führen (Bettelli et al., 2006; Mangan et al., 2006; Veldhoen et al., 2006).

Mittlerweile sind mehrere Th17-Differenzierungswege und die auslösenden Zytokine bekannt, wobei der wichtigste Weg über die Zytokine IL-6 und TGF- β erfolgt (Bettelli et al., 2006; Mangan et al., 2006; Veldhoen et al., 2006). Das proinflammatorische Zytokin IL-6 aktiviert zusammen mit dem Antigen-signal den JAK-STAT3-Signalweg und es folgt die Formation von pSTAT3 Homodimeren (Heinrich et al., 2003). Dies wiederum erhöht die Produktion des IL-17-fördernden Zytokins IL-21 durch die direkte Bindung am *il-21* Promotor (Wei et al., 2007). IL-21 vervielfacht sein Signal durch autokrine Signalkaskaden über den auf den T-Zellen exprimierten IL-21R und führt außerdem die Expression von IL-23 herbei. IL-21 und IL-23 rufen jeweils zusammen mit TGF- β unabhängig von IL-6 die IL-17-Produktion hervor (Zhou et al., 2007). Durch Mausexperimente ließ sich zeigen, dass eine IL-23-Suppression eine mangelnde Produktion von IL-17 in Th17-Zellen nach sich zieht und so zur Resistenz gegen EAE führt (Bettelli et al., 2008).

Die drei oben genannten Zytokine (IL-6, IL-21 und IL-23) aktivieren den STAT3 Signalweg und dadurch wird der linienspezifische Transkriptionsfaktor ROR γ t eingeschaltet (Ivanov et al., 2006). *In vitro* ist die Expression von ROR γ t in Th-Zellen für die Transkription von IL-17A und IL-17F erforderlich, während in Mäusen ohne *Rorc* (das ROR γ t kodierende Gen) keine Th17-Antwort in entzündlichem Gewebe auftritt und daher diese Mäuse eine Resistenz gegen Autoimmunerkrankungen zeigen (Ivanov et al., 2006; Leppkes et al., 2009).

Wie oben erwähnt, aktiviert TGF- β zusammen mit IL-6 das Th17-Differenzierungsprogramm. TGF- β kann aber sowohl FoxP3 (den entscheidenden Transkriptionsfaktor regulatorischer Zellen) als auch ROR γ t und ROR α induzieren; allerdings neigt es in entzündlichen Bedingungen (also in Gegenwart von IL-6) zur

Förderung der Th17-Polarisation (Zhou et al., 2008). Daher steht die Produktion von IL-17 mit der FoxP3 Expression in reverser Korrelation (Bettelli et al., 2008). Mehrere Studien belegten außerdem, dass FoxP3 mit ROR γ t in Wechselwirkung tritt (Ichiyama et al., 2008; Zhang et al., 2008) und so die Transkriptionsaktivität von ROR γ t beeinträchtigt.

Neben ROR γ t und STAT3 regulieren auch andere Transkriptionsfaktoren die Th17-Differenzierung. Ein bereits bekannter Vertreter hiervon ist IRF4, welches wie oben beschrieben auch in der Th2- und Th9-Zelldifferenzierung beteiligt ist. *Irf4*^{-/-}-Mäuse weisen keine Th17-Differenzierung auf und sind somit gegen EAE resistent (Brustle et al., 2007). Die ROR γ t - und ROR α - Expression war nach Zugabe von IL-6 und TGF- β in *Irf4*^{-/-} Mäusen stark reduziert und die Überexpression von ROR γ t und ROR α konnte die Produktion von IL-17 nur zum Teil wiederherstellen (Brustle et al., 2007; Huber et al., 2008). Daher liegt IRF4 in der Signalgebung auf einer höheren Ebene als die Transkriptionsfaktoren ROR γ t und ROR α .

BATF (*basic leucine zipper transcription factor, ATP-like*) - ein Mitglied der AP (*activator protein*) Transkriptionsfaktor-Familie - reguliert auch die Th17-Differenzierung. Bei *Batf*^{-/-} Mäusen fehlte die Differenzierung von IL-17-sezernierenden Th-Zellen unter Th17 Bedingungen, daher waren die Mäuse ebenfalls gegen EAE resistent (Schraml et al., 2009).

BATF interagiert mit dem Transkriptionspartner JunB und bildet Dimere, die ihrerseits an die *Il17*-, *Il21*- und *Il22*-Promotoren binden (Schraml et al., 2009).

Darüber hinaus haben in der Th17-Differenzierung noch zwei weitere Transkriptionsfaktoren Relevanz, nämlich AhR (*aryl hydrocarbon receptor*) und Ikb (*nuclear Ikb family member*) ζ . Aktivierung von AhR durch hoch-affine Liganden während der Th17-Zelldifferenzierung führt zur Erhöhung der Th17-Zell-Zahlen und ihrer Zytokine und die CD4⁺T-Zellen der Mäuse mit AhR-Defizienz zeigen keine IL-22 Produktion und eine reduzierte Th17-Zelldifferenzierung (Veldhoen et al., 2008a). Die Überexpression von Ikb ζ in naiven CD4⁺T-Zellen induziert zusammen mit ROR γ t und ROR α eine starke Th17-Zelldifferenzierung, während die *Ikb* ζ ^{-/-} Mäuse einen Defekt der Th17-Differenzierung und die Resistenz gegen EAE aufweisen (Okamoto et al., 2010).

Nach dem Zytokinprofil von Th17-Zellen legten die früheren Forschungsarbeiten nahe, die Th17-Zellen bezüglich ihrer Rolle in Autoimmunerkrankungen funktionell in pathogene- und nichtpathogene- Subpopulationen zu unterteilen. Eine Gruppe belegte, dass die pathogenen Th17-Zellen neben der IL-17 die Produktion von IFN- γ aufwiesen

und IL-1 β als pro-inflammatorischer Regulator die Induktion von pathogenen Th17-Zellen unterstützte, während IL-2 die IL-10 produzierenden nichtpathogenen Th17-Zellen erzeugte (Zielinski et al., 2012). Eine andere Gruppe berichtete, dass die IL-23-abhängige Produktion von TGF- β 3 in Th17-Zellen die Induktion des pathogenen GM-CSF auslöste (Lee et al., 2012).

Neben Vertretern der IL-17-Familie wie IL-17A und IL-17E produzieren die aktivierten Th17-Zellen verschiedene andere Zytokine, darunter IL-21, IL-22 und GM-CSF. IL-17-Rezeptoren befinden sich beispielsweise auf Fibroblasten, Epithelzellen und Keratinozyten. Diese Rezeptor-tragenden Körperzellen produzieren unter dem Einfluss von IL-17 ihrerseits Zytokine, nämlich IL-6 sowie die Chemokine CXCL8 und CXCL2 sowie Faktoren mit Einfluss auf die Granulozytenbildung im Knochenmark und die Entwicklung von Makrophagen. Eine wichtige Funktion von IL-17 ist die Sekretion von Zytokinen und Chemokinen, die zur Einwanderung von Neutrophilen in das Infektionsgebiet führen. Weitere Wirkungen der Th17-Zellen sind die Produktion von antibakteriellen Peptiden (über IL-17) und die Verstärkung des angeborenen Immunsystems im Rahmen der Immunantwort.

Eine Übersicht über die Differenzierung der in diesem Kapitel angesprochenen T-Zell-Subpopulationen ist in Abbildung 1 dargestellt.

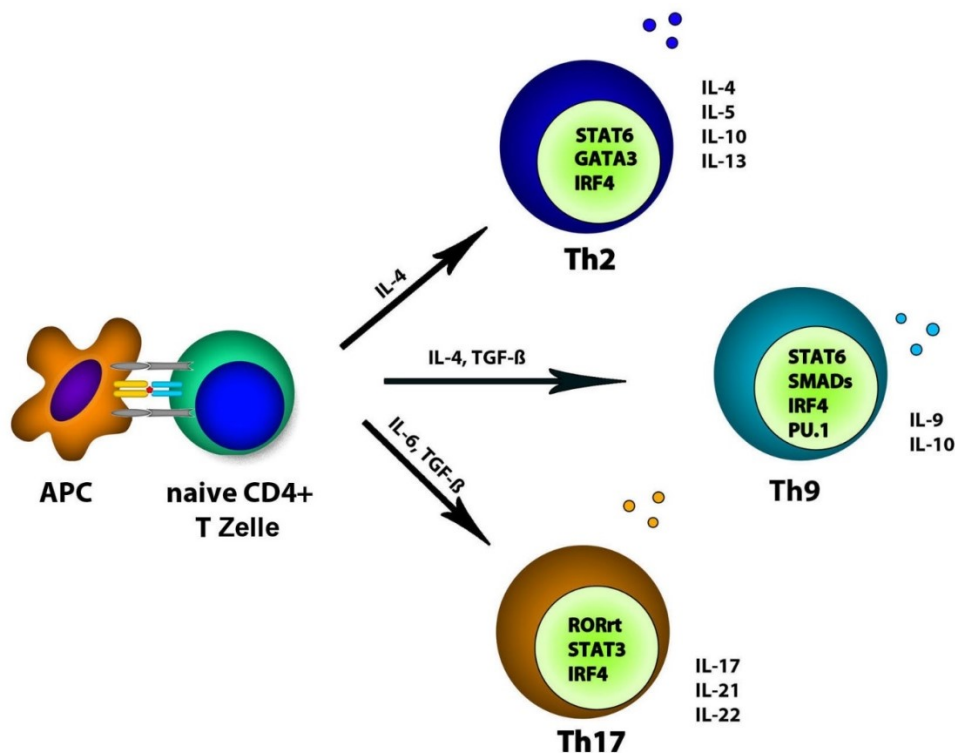


Abbildung 1. Schema einiger Th-Zelldifferenzierungen.

1.2.2 Beispiele für durch Th-Zellen vermittelte Krankheiten

Über die Sekretion ihrer unterschiedlichen Zytokine tragen T-Zellen mit Helferfunktion sowohl zur Immunabwehr als auch zur Pathogenese im Wirt bei.

1.2.2.1 Multiple Sklerose (MS)

Der Überschuss an Th1-Zellen vermittelt einen chronischen Entzündungszustand. Eine Immun-Dysbalance, die die Th1-Zellen begünstigt, liegt häufig bei Autoimmunerkrankungen vor. Sie spielen als entzündungsfördernde Zellen bei MS, Diabetes Typ I oder Rheumatoider Arthritis eine Rolle. Th1-Zellen gelten zusammen mit Th17-Zellen als die wichtigen pathogenen T-Zellen für MS. Th1-Zellen wurden durch ein Experiment als wichtige Auslöser der MS bestätigt, in dem Mäuse mit p40 (eine Subeinheit des IL-12) -Defizienz die Resistenz gegen EAE gezeigt haben, wobei ja IL-12 für die Th1-Differenzierung notwendig ist (Fletcher et al., 2010). Eine andere Studie, die zeigt, dass die Behandlung von MS Patienten mit IFN- γ die Krankheit verschärft, belegt auch die pathogene Rolle von Th1-Zellen in der MS (Panitch et al., 1987). Th1-Zellen tragen auf zwei Weisen zur Entstehung und Entwicklung der MS bei: Einerseits aktivieren sie Makrophagen durch die Produktion von IFN- γ und die aktivierten Makrophagen zerstören ihrerseits die Myelinhülle; andererseits zerstören Th1-Zellen direkt die Myelinhülle durch die Sekretion von TNF- α und - β (Nagelkerken, 1998).

In 2003 bewies eine Forschungsgruppe, dass IL-23 in der Autoimmunerkrankung des Gehirns eine essenzielle Rolle spielt (Cua et al., 2003), welches mit IL-12 die gemeinsame p40-Subeinheit hat. IL-23 fördert die Entwicklung von Th17-Zellen, die Zytokine IL-17A, F, TNF und IL-6 produzieren (Langrish et al., 2005). Die Epithelzellen der Blut-Hirn-Schranke exprimieren die Zytokinrezeptoren für IL-17 und IL-22, was den diese Zytokine produzierenden Th17-Zellen ermöglicht, die Blut-Hirn-Schranke zu zerstören. Th17-Zellen sind darüber hinaus in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke zu durchdringen und die Entzündung dadurch zu fördern, dass sie weitere CD4⁺T-Zellen rekrutieren und Entzündungsmediatoren freisetzen (Kebir et al., 2007). Th17-Zellen setzen außerdem das pathogene Zytokin GM-CSF frei, das unter IL-23

hoch reguliert wird (El-Behi et al., 2011). Dabei sezernieren die Th17-Zellen, die sich nur durch die Zytokine IL-6 und TGF- β ausdifferenzieren, zwar große Menge an IL-17A und IL-10, aber sie sind nicht pathogen. Im Gegensatz dazu gibt IL-23 den Th17-Zellen die pathogene Aktivität durch die Induktion von GM-CSF, das die Reifung und Aktivierung von Entzündungszellen fördert (El-Behi et al., 2011; Rostami and Ciric, 2013). Die Suppression der Generation und der Funktion von Th17-Zellen führt folglich zur Protektion vor EAE.

Obwohl MS und ihr Tiermodell EAE zu den Th1- und Th17 - vermittelten Krankheiten klassifiziert werden, zeigen neuere Daten, dass auch IL-9 mit diesen Krankheiten in Verbindung steht. Der adoptive Transfer von Th9-polarisierten Zellen förderte die Entwicklung von EAE (Jager et al., 2009); der Einsatz der *Il9*^{-/-} Maus und die Neutralisierung von IL-9 durch Antikörper erzielten einen schützenden Effekt gegen EAE oder führten zur verzögerten Entwicklung der EAE (Li et al., 2010; Li et al., 2011). Allerdings ist bisher nicht geklärt, welche Mechanismen hierbei zugrunde liegen.

1.2.2.2 Das allergische Asthma bronchiale

Das allergische Asthma bronchiale ist durch eine reversible Obstruktion der Atemwege, bronchiale Hyperreagibilität und pulmonale Entzündung charakterisiert. Im Mittelpunkt der allergischen Reaktion stehen die Th2-Zellen. Durch die Freisetzung der Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 koordinieren sie die Rekrutierung und Aktivierung von Mastzellen, basophilen und eosinophilen Granulozyten sowie die Produktion von IgE durch B-Zellen. IL-13 ist der dominierende Faktor für die Pathophysiologie des Asthmas. IL-13 ist entscheidend für die Ausprägung einer AHR (*airway hyperresponsiveness*) und trägt ebenso wie IL-4 zum Immunoglobulin-Klassenwechsel aktivierter B-Zellen und damit zur Ausschüttung von IgE und IgG4 bei (Wills-Karp et al., 1998). Im Maus-Modell konnte gezeigt werden, dass IL-13 für die Induktion einer verstärkten Mukusproduktion ein essentieller Faktor ist (Wills-Karp, 2004) und bereits in geringen Mengen die Mukusproduktion sehr stark erhöht. IL-4 begünstigt das Wachstum von Mastzellen und die Einwanderung von Eosinophilen in das Lungenepithel, aktiviert B-Zellen, fördert unter anderem die Synthese von IgE und stimuliert ebenfalls die Mukussekretion der Becherzellen. IL-5 ist wesentlich für Entstehung, Reifung und Aktivierung von eosinophilen Granulozyten. In Abwesenheit von IL-5 ist die Zahl der Eosinophilen in Blut und BAL nach einer Th2-Zell-

Aktivierung nicht erhöht. Die IFN- γ -produzierenden Th1-Zellen werden als Gegenspieler der IL-4-produzierenden Th2-Zellen betrachtet und lange wurde deshalb den Th1-Zellen beim allergischen Asthma eine entscheidende protektive Rolle zugesprochen.

Im Menschen und in Mäusen zählt auch das Zytokin IL-9 der Th9-Zellen zu den Risikofaktoren für Asthma. Im Menschen liegt das *IL9*-Gen in dem Chromosom 5q31-q33 und bei Mäusen im Chromosome 13, wo sich viele für die Atopie und AHR relevante Gene konzentrieren (Stassen et al., 2012). Darüber hinaus gab es den Beweis, dass eine *IL9*-allelische Variation mit einem erhöhten IgE Spiegel im Blutserum korreliert (Doull et al., 1996). Die selektive Überexpression von IL-9 im Lungengewebe bestätigte auch, dass IL-9 in der Entstehung von Asthma von entscheidender Bedeutung ist. In den Lungen von Mäusen, in denen IL-9 überexprimiert war, traten die Entzündungen der Atemwege mit der charakteristischen Infiltration von Eosinophilen und Lymphozyten und den typischen pathologischen Veränderungen auf (Hypertrophie von Epithelzellen, Schleimproduktion und übermäßige subepitheliale Ablagerung von Collagen), ohne dass die Mäuse vorher mit dem Allergen versetzt worden waren (Temann et al., 1998). Es gab weiterhin mehrere Studien, die belegten, dass IL-9 beim Asthma die Mastzellen (Eklund et al., 1993), B-Zellen (Petit-Frere et al., 1993), Lungenepithelzellen (Dong et al., 1999) und Glattmuskelzellen (Baraldo et al., 2003) anregt und so die Zellen dazu veranlasst, in ihrer Kooperation ein asthmatisches Krankheitsbild zu entwickeln.

Obwohl Th2-Zellen sowie deren Zytokine eine zentrale Rolle im Asthma spielen, zeigten neue Studien, dass auch Th17-Zellen und IL-17 in der Entwicklung und dem Fortlauf des Asthmas unerlässlich waren (Cosmi et al., 2011). Allerdings unterschied sich diese Asthmaform gegenüber der durch Th2-Zellen vermittelten durch den Influx von Neutrophilen statt Mastzellen. Die durch OVA (*ovalbumin*) als Modellallergen sensibilisierten Mäuse hatten dabei erhöhte *Il17* m(*messenger*) RNA Spiegel in den Lungen, welche mit der Infiltration von Neutrophilen korrelierten, und anti-IL-17-Antikörper erzielten eine Reduktion der Rekrutierung der Neutrophilen in die Lungen (Hellings et al., 2003).

Kobayashi et al. berichteten, dass IL-1 β , welches als Reaktion auf das asthmatische Antigen gebildet wird, sowohl Th2- als auch Th17-Zellen herbeiführt (Kobayashi et al., 2013).

1.2.2.3 IBD (inflammatory bowel disease)

Der Begriff „chronische idiopathische Enteropathie“ oder englisch “Inflammatory Bowel Disease“ beschreibt einen Krankheitskomplex, welcher durch eine chronische, persistierende oder rezidivierende, gastrointestinale Symptomatik unbekannter Ursache in Zusammenhang mit histologischen Merkmalen einer Darmentzündung gekennzeichnet ist.

Man unterscheidet zwei Arten von IBD: CD (*crohn`s disease*), in der meist Th1-Zytokine hoch reguliert sind und UC (*ulcerative colitis*), bei der die Th2 Immunreaktion dominant ist (Castellanos-Rubio et al., 2009; Heller et al., 2005).

Vor Kurzem ist es bekannt geworden, dass auch IL-9-produzierende Th9-Zellen mit pathologischen Veränderungen von IBD in Verbindung stehen. Th9-Zellen sind am Krankheitsbild der UC, nicht der CD beteiligt (Gerlach et al., 2014). Sowohl *Il9^{-/-}* als auch *Spi.1^{-/-}* Mäuse waren gegen eine experimentelle Kolitis resistent, was zeigt, dass Th9-Zellen in der Kolitis von entscheidender Bedeutung sind. IL-9 trug zur Pathologie der experimentalen Kolitis auf zwei Weisen bei: Erstens verhinderte es die Barrierefunktion der Darmepithelien und andererseits begünstigte IL-9 im Darm die pathogene Th2-Immunreaktion (Gerlach et al., 2014; Hufford and Kaplan, 2014).

Die Rolle von Th17-Zellen in der Pathogenese von IBD ist umstritten. Es gibt einige Befunde, die der pathogenen Rolle von Th17-Zellen in IBD widersprechen, aber die meisten Daten bestätigten einen stark pathogenen Einfluss der Th17-Zellen in der IBD. Mäuse mit Gendefekt für Th17-Marker (IL-23p19, IL-17 und IRF4) waren vor Kolitis geschützt (Mudter et al., 2011; Yen et al., 2006; Zhang et al., 2006). Genome-wide association Studies in CD Patienten zeigten, dass die Th17 Marker IL-23R und CCR (*C-C chemokine receptor*) 6 im aktiven Stadium der Krankheit hoch exprimiert sind, und andere Studien belegten, dass die Patienten in der aktiven Phase hohe Menge an IL-17⁺ IL-23p19⁺ Zellen in der Lamina propria und erhöhte m (messenger RNA Expressionslevel für IL-17, IL-23 und CCR6 zeigten (Duerr et al., 2006; Fujino et al., 2003; Holtta et al., 2008; Lee et al., 2013).

1.3 Der Transkriptionsfaktor - IRF4

1.3.1 Transkriptionsfaktoren

Ein Transkriptionsfaktor ist ein Protein, das die Transkription seines Zielgens beeinflusst, wobei es an den Promotor oder Enhancer des Gens entweder direkt oder indirekt über andere DNA - bindende Proteine bindet. Durch die Aktivierung und Hemmung von Genen über die verschiedenen Transkriptionsfaktoren können die unterschiedlichen Zellen der Organismen verschiedene Funktionen aufweisen, obwohl sie dieselben genetischen Informationen besitzen. Fast 8% der menschlichen Gene kodieren für Transkriptionsfaktoren. Sie spielen in der Zellentwicklung und Signalübertragung in der Zelle eine entscheidende Rolle. Es wird angenommen, dass Mutationen in Transkriptionsfaktoren Erkrankungen wie Diabetes, Autoimmunerkrankungen sowie Tumoren verursachen.

Transkriptionsfaktoren weisen bezüglich ihrer Sequenz eine modulare Struktur von höher konservierten Bereichen auf. Der typische Transkriptionsfaktor hat eine DNA-Bindedomäne (*DBD; DNA binding domain*) und eine oder mehrere regulatorische Domänen (*RD; regulatory domain*). DBD vermitteln die Bindung des Transkriptionsfaktors an die Promotor-/Enhancer-region und starten damit den Transkriptionsvorgang. Die RD, andererseits, steuern die Transkriptionsaktivität entweder alleine oder durch die Bindung mit anderen Transkriptionsfaktoren.

Transkriptionsfaktoren können aufgrund verschiedener Kriterien eingeteilt werden. Aufgrund der Struktur ihrer DBD unterscheidet man z.B. Transkriptionsfaktoren mit HTH (*helix-turn-helix*)-Motiv, helix-loop-helix-Motiv, HMG-Box-Domäne, Homöobox (die an DNA bindende, für die Homöodomäne kodierende Sequenz), Leucin-Zipper-Motiv, POU-Domäne und Zink-Finger-Domäne. Auf Basis von strukturellen Ähnlichkeiten der einzelnen Module können Transkriptionsfaktoren in Familien und Subfamilien klassifiziert werden.

1.3.2 IRF-Familie

Während des Studiums der Regulation des *Ifn β* -Gens in einer Virusinfektion wurde das erste Mitglied der IRF Familie im Jahr 1988 erkannt, welches an dem Promotor dieses

Gens bindet und dessen Transkription reguliert (Miyamoto et al., 1988). Danach wurden 8 weitere IRFs gefunden, die als die IRF-Familie zusammengefasst wurden. Einige von Ihnen wurden ursprünglich nicht als Mitglieder der IRF Proteinfamilie erkannt und hatten daher mehrere andere Namen, wie z.B. PIP/LSIRF/ICSAT für IRF4, ICSBP für IRF8 und ISGF3 γ für IRF9 (Eisenbeis et al., 1995; Fu et al., 1990; Matsuyama et al., 1995; Weisz et al., 1992; Yamagata et al., 1996).

Alle Mitglieder der IRF-Familie haben eine gemeinsame modulare Struktur mit der DBD im N-terminalen und der RD im C-terminalen Bereich. Die DBD, die 5 Mal wiederholte Tryptophan Aminosäuren in ihrer ~115 Aminosäurestruktur besitzt, bildet HTH-Strukturen und erkennt spezifisch die DNA-Reihung 5'-AAN NGA AA-3', welche ISRE (*interferon sensitive response element*) genannt wird (Lohoff and Mak, 2005; Mamane et al., 1999; Taniguchi et al., 2001).

Der C-terminale Bereich des IRFs ist nicht gut konserviert und vermittelt möglicherweise die Interaktion mit anderen IRF-Mitgliedern, anderen Transkriptionsfaktoren und Cofaktoren. Es wurde angenommen, dass sich je nach dem IRF-Subtyp zwei unterschiedliche Arten von IRF-Verbindungsmodulen (IAD (*IRF association domain*) Typ1 oder 2) im C-terminalen Bereich befinden. IRF1 und IRF2 besitzen IAD2 und andere Mitglieder haben hingegen den Typ 1 IAD, dessen Struktur ähnlich wie die der MH (*mad-homology*) 2 Domäne des SMAD Transkriptionsfaktors ist (Lohoff and Mak, 2005).

Die neun Mitglieder der IRF-Familie haben diverse Funktionen in der Immunantwort. Sie regulieren die angeborene Immunantwort durch die Beteiligung im PRR- (*pattern recognition receptor*) Signalweg, sowie beim Zellzyklus und bei der Entstehung der verschiedenen Immunzellen wie z.B. dendritischer Zellen, Myeloidzellen, NK-, B- und T-Zellen.

Studien zufolge fungieren IRF1 (Kim et al., 2004), IRF2 (Guichard et al., 2012), IRF3 (Kim et al., 2006), IRF5 (Pimenta et al., 2015), IRF6 (Botti et al., 2011), IRF7 (Bidwell et al., 2012) und IRF8 (Waight et al., 2014) als Tumorsuppressorgene, während dagegen IRF9 (Luker et al., 2001) eine onkogene Funktion besitzt. Die Rolle von IRF4 in der Onkogenese ist umstritten, da eine Studie zeigt, dass die Expression von *Irf4* mRNA durch die Infektion von HTLV (*human T-cell lymphotropic virus*) -1 induziert wurde (Sharma 2002), und hingegen zeigt eine andere Studie, dass das *Irf4* Transkriptionsniveau in den CML (*chronic myeloid leukemia*) Patienten maßgeblich erniedrigt war (Schmidt et al., 2000).

1.3.3 IRF4

1.3.3.1 Die Struktur von IRF4

IRF4 ist ein Mitglied der IRF-Familie, dessen kodierendes Gen auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 beim Menschen liegt (Grossman et al., 1996). Das aus 19kb (*kilobase*) bestehende *Irf4* Gen setzt sich aus 9 Exons und 8 Introns zusammen. Das kodierte IRF4 Protein besteht aus 450 Aminosäuren mit einer molekularen Masse von 51,8 kD (*kilodalton*).

Anders als die anderen IRF-Mitglieder wird die Expression von IRF4 auf hämatopoetische Zelllinien und Adipozyten restringiert und durch Interferon Typ 1 und 2 nicht beeinflusst (Eguchi et al., 2008; Lehtonen et al., 2005; Lohoff et al., 2002; Mittrucker et al., 1997).

Strukturell und funktionell ist IRF4 in 2 Domänen (DBD und RD) unterteilt wie die anderen IRF-Mitglieder. Die DBD ist für die Bindung an den Promotor des Zielgens verantwortlich und die RD steht zur Wechselwirkung mit den anderen Transkriptionsfaktoren zur Verfügung. Die RD wiederum teilt sich aufgrund der Komposition und Funktion in mehrere Subdomänen einschließlich der IAD ein, deren genaue Funktionen nicht im Detail geklärt wurden. Die RD enthält auch die sogenannte autoinhibitorische Domäne. Man denkt, dass diese physisch mit der DBD interagiert, dadurch mit der Bindung an den Promotor interferiert und so die autoinhibitorische Situation aufrechterhalten wird. Nach der Interaktion mit einem anderen Partnertranskriptionspartner wird die inhibitorische Wirkung entlastet, sodass IRF4 an den Erkennungsbereich von DNA mit erhöhter Affinität bindet (Brass et al., 1996; Remesh et al., 2015).

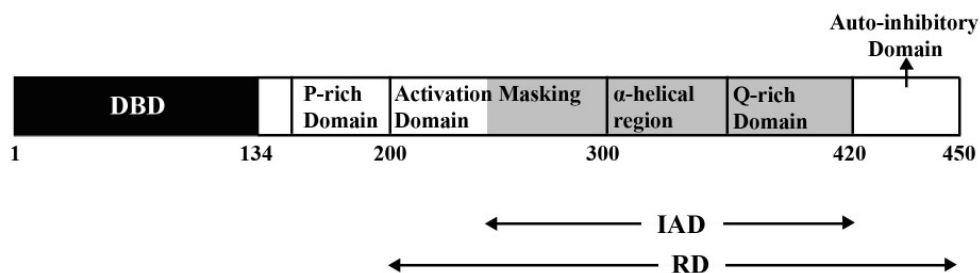


Abbildung 2. Die Strukturelle Darstellung von IRF4 (Marecki and Fenton, 2002).

Im N-terminalen Bereich befindet sich die DBD, die sich aus 134 aa (*amino acid*) zusammensetzt, und es folgt die RD, die sich wiederum in mehrere Subdomänen unterteilt. P: Prolin und Q: Glutamin.

1.3.3.2 Die Funktion von IRF4

1.3.3.2.1 Wechselwirkung mit anderen Transkriptionsfaktoren

Allgemein bindet IRF4 allein schlecht an den Promotor des Zielgens, während es in der Verbindung mit anderen Transkriptionsfaktoren eine hohe Bindungsaffinität für den Promotor zeigt.

1.3.3.2.1.1 PU.1

Die Wechselwirkung zwischen PU.1 und IRF4 wurde intensiv analysiert. Diese Wechselwirkung umfasst 2 unterschiedliche Interaktionsmotive: Die Interaktion zwischen den DBDs von PU.1 und IRF4 einerseits sowie diejenige zwischen der phosphorylierten PEST (*rich in prolin, glutamic acid, serine and threonine*) Region des PU.1 und der autoinhibitorischen Domäne in IRF4.

Laut Krystallisierungsstudien binden die DBDs von PU.1 und IRF4 kooperativ an ein 21mer aus der DNA des λ B Elementes der leichten Kette des Immunglobulins und bilden so gemeinsam die 3 Komponenten des „ternary complex“ (Escalante et al., 2002a). In weiteren Experimenten wurde bekannt, dass die beiden DBDs an der gegenüberliegenden Seite der S-geformten DNA binden und ihre Bindungsstellen teilweise überlappen (Escalante et al., 2002a). Darüber hinaus stehen die DBDs der beiden Transkriptionsfaktoren miteinander in Wechselwirkung, wobei Arg222 und Lys223 in PU.1 an Asp117 in IRF-4 elektrostatisch binden. Zu dieser Wechselwirkung kommen noch der van-der-Waals-Kontakt der Leu116 und Val111 in IRF4 mit dem Arg222 in PU.1 und der Hydrogenbond zwischen Lys219 in PU.1 und His56 in IRF4 (Escalante et al., 2002a) hinzu. Dies wurde durch EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*) -Versuche nachgewiesen, die auf Alanin-punktmutierten Molekülen basierten.

Wie erwähnt, interagieren IRF4 und PU.1 nicht nur in der DBD, sondern die Wechselwirkung findet auch in der PEST-Domäne von PU.1 und der IAD von IRF4 statt, wobei die Phosphorylierung von Ser148 des PU.1 und aa Lys399 in IRF4 von

entscheidender Bedeutung sind (Brass et al., 1999). Die Wechselwirkung zwischen der PU.1 PEST-Domäne und der IRF4-IAD ist DNA-unabhängig, trägt aber zur Entstehung des „ternary complex“ mit der DNA bei, wobei die DNA-Bindung an den ETS-IRF composite elements (EICEs; 5'-GGAAnnGAAA-3') stattfindet. Dies geschieht besonders in B-Lymphozyten, wo PU.1 stark exprimiert ist.

1.3.3.2.1.2 *BATF-JUN Proteine*

AP-1 ist ein kollektiver Terminus für dimerische Transkriptionsfaktoren, die sich aus JUN-, FOS-, JDP-, oder ATF (*activating transcription factor*)- Proteinen zusammensetzen, die die gemeinsame bZIP (*basic region leucin zipper*)-Struktur aufweisen (Hess et al., 2004). Das ATF-Mitglied BATF bildet mit JUN das Heterodimer BATF-JUN, welches in Wechselwirkung mit IRF4 tritt und so die CD4⁺-, Effektor CD8⁺- und dendritische Zelldifferenzierung (Glasmacher et al., 2012; Kurachi et al., 2014; Li et al., 2012) bewirkt. In dem dendritischen Zelldifferenzierungsexperiment wurde bewiesen, dass die aa 55, 56, 63, 77 von BATF für die Funktion und die Wechselwirkung mit IRF4 entscheidend sind, da BATF mit den Mutationen H55Q/L56A/K63D/E77K weniger als 10 % der WT BATF-Aktivität in der CD103⁺ DC-Differenzierung besaß und keine Wechselwirkung mit IRF4 mehr zeigte (Tussiwand et al., 2012).

Der Proteinkomplex aus AP-1 und IRF4 bindet in T-Zellen an AP-1-IRF4 composite elements (AICEs; 5'-TGAnTCA/GAAA-3') auf der DNA. Die Interaktion zwischen IRF4 und dem BATF-JUN-Heterodimer wurde in IL-21-stimulierten, prä-aktivierten T-Zellen und auch in Th0-, Th2-, Th9-, Th17-, B- und dendritischen Zellen nachgewiesen (Glasmacher et al., 2012; Li et al., 2012). Da die beiden Faktoren funktionell kooperieren, wurden die Bindungen von IRF4 in *Batf*^{-/-}-T-Zellen und von BATF in *Irif4*^{-/-}-T-Zellen an die AICE-Stelle abgeschwächt. In dem CD8⁺-T-Zellexperiment wurde auch die Interaktion zwischen IRF4 und BATF-JUN nachgewiesen. Der BATF-JUN/IRF-4 Komplex bindet in CD8⁺-T-Zellen an die Gene der linienspezifischen Transkriptionsfaktoren (T-bet und Blimp (*B-lymphocyte-induced maturation protein*1)), beschleunigt die Expression von denen und reguliert dadurch die Funktion der CD8⁺-T-Zellen (Kurachi et al., 2014).

1.3.3.2.1.3 NFAT (nuclear factor of activated T-cells)

NFAT Proteine existieren in verschiedenen Isoformen und entfalten ihre Funktion zur Regulation von Zielgenen auch über Protein-Protein Interaktionen. Das am besten untersuchte Modell ist die Steuerung des *Il4*-Promotors in Th2-Zellen, wobei NFAT hier mit AP-1 (Rooney et al., 1995) und c-maf (Ho et al., 1996) in Wechselwirkung eintritt und so am *Il4* Promotor bindet.

IRF4 interagiert mit NFAT und steuert als Partner der Isoform NFATc2 ebenfalls die *Il4* Genexpression und die anschließende Th2-Zelldifferenzierung. Diese Wechselwirkung war abhängig von der C-terminalen Domäne in IRF4 (Rengarajan et al., 2002).

1.3.3.2.1.4 SMAD

SMAD-Proteine sind eine Gruppe von Transkriptionsfaktoren, die die Signale der TGF- β Familie in den Zellkern weiterleiten. Neue Studien zeigen, dass IRF4 für die IL-9 Expression in Th-Zellen mit Smad2/3 physisch und funktionell interagiert und dieser IRF4-Smad Komplex zur Modifikation der Chromatinstruktur führt. IRF-4 alleine kann zwar an den *Il9* Promotor binden, aber für die Aktivierung der *Il9* Transkription ist die Wechselwirkung mit Smad2/3 erforderlich (Tamiya et al., 2013).

1.3.3.2.1.5 Sonstige Transkriptionsfaktoren, die mit IRF4 in Wechselwirkung stehen

Außer den oben erwähnten Transkriptionsfaktoren gibt es mehrere andere Partnertranskriptionsfaktoren, die mit IRF4 interagieren. Zheng et al. publizierte, dass IRF4 in Treg-Zellen mit FoxP3 interagiert und dadurch die Th2-Differenzierung blockiert, indem dieser Komplex die IRF4-downstream Transkription modifiziert (Zheng et al., 2009). Gupta et al. bestätigten *in vitro* sowie *in vivo*, dass IRF4 in der Lage ist, mit STAT6 und BCL (*B-cell lymphoma*) -6 physisch zu interagieren (Gupta et al., 1999). ROR γ t, welches für die Th17-Zelldifferenzierung nötig ist, wurde auch als Transkriptionsfaktor gefunden, der mit IRF4 wechselwirkt (Ouyang et al., 2011).

1.3.3.2.2 Funktionen von IRF4 bei der Zelldifferenzierung im adaptiven Immunsystem

Der Transkriptionsfaktor IRF4 gilt als zentraler Regulator bei der B- und T-Zelldifferenzierung.

1.3.3.2.2.1 CD8⁺T-Zelldifferenzierung

Erste Hinweise auf eine Funktion von IRF4 in CD8⁺T-Zellen lieferte die Beobachtung, dass *Irf4*^{-/-} Mäuse eine reduzierte Zytotoxische Antwort bei der Infektion mit LCMV (*Lymphocyte Choriomeningitis Virus*) gezeigt haben (Mittrucker et al., 1997). Auf Grund dieser Vorarbeiten wurde die Hypothese aufgestellt, dass IRF4 ein Schlüsselregulator der Differenzierung von CD8⁺T-Zellen ist.

In einer jüngeren Publikation wurde gezeigt, dass *Irf4*^{-/-}CD8⁺T-Zellen eine *Listerien*-Infektion im Gegensatz zu Kontrollzellen nur eingeschränkt angreifen konnten (Raczkowski et al., 2013). Dieser Defekt beruhte sowohl auf Problemen bei der Generierung einer substantiellen Population spezifischer CD8⁺T-Zellen, als auch auf eingeschränkten Effektorfunktionen dieser Zellen. Der abweichende Phänotyp der *Irf4*^{-/-}CD8⁺T-Zellen deutete zwar im Prinzip auf eine Differenzierung zu zentralen Gedächtniszellen oder deren Vorläufern hin. Die Analyse der Langlebigkeit von spezifischen *Irf4*^{-/-}CD8⁺T-Zellen und ihrer Effektormechanismen im Rahmen einer Sekundärinfektion zeigten aber deutliche Nachteile gegenüber den Kontrollzellen. Die Untersuchung der Expression verschiedener, die Effektor- und Gedächtniszelldifferenzierung beeinflussender Transkriptionsfaktoren ergab eine deutliche Abweichung der Expression dieser Faktoren in *Irf4*^{-/-}CD8⁺T-Zellen. Diese Ergebnisse zeigten, dass IRF4 zur Generierung sowohl funktionaler CD8⁺T-Effektor- als auch CD8⁺T-Gedächtniszellen unabdingbar war. Auf molekularer Ebene wurde die IRF4-Expression durch den T-Zell-Rezeptor-Signalweg induziert und konnte durch IL-12 amplifiziert werden. IRF4 hatte dann einen positiven Effekt auf die Expression der die Entwicklung terminaler CD8⁺T-Effektorzellen unterstützenden Transkriptionsfaktoren Blimp1, ID (*inhibitor of DNA binding protein*) 2 und T-bet (Huber and Lohoff, 2014). Im Gegensatz dazu hemmte IRF4 die Induktion der Transkriptionsfaktoren BCL-6 und EOMES (*eomesodermin*), welche die Gedächtnisformierung fördern (Kaech and Cui, 2012).

Es wurde belegt, dass der Transkriptionsfaktor IRF4 abhängig von der Affinität des TCRs in unterschiedlicher Menge induziert wird und als ein dosisabhängiger Regler der metabolischen Funktion von aktivierten T-Zellen fungiert. IRF4 reguliert die Expression von Schlüsselmolekülen, die für die aerobe Glykolyse von Effektor-T-Zellen erforderlich sind, und ist so für die klonale Expansion und die Effektorfunktion von antigenspezifischen CD8⁺T-Zellen von entscheidender Bedeutung. Somit ist IRF4 ein unverzichtbares Molekül, welches das TCR -Signal in die entsprechenden Transkriptions-Programme übersetzt, die mit der Stoffwechselfunktion von T-Zellen während der klonalen Selektion und Effektorfunktion verknüpft sind (Man et al., 2013).

1.3.3.2.2 CD4⁺T-Zelldifferenzierung

Die Differenzierung von naiven CD4⁺T-Zellen zu verschiedenen Th-Zellpopulationen wird, wie weiter oben bereits teilweise angesprochen, ebenfalls durch IRF4 beeinflusst. Unter Einfluss von IL-4 steigt normalerweise die Expression des Transkriptionsfaktors GATA3, der für die Differenzierung von Th2 entscheidend ist. In *Irf4*^{-/-}CD4⁺T-Zellen wird das GATA3 Niveau dagegen nicht hochreguliert. Die Entstehung von Th2-Zellen ist in *Irf4*^{-/-}Mäusen entsprechend inhibiert (Lohoff et al., 2002).

Das Zytokin IL-9 ist wichtig für die Funktion von Mastzellen und die dieses Zytokin produzierenden Th9-Zellen sind für eine Vielzahl der Asthma Symptome verantwortlich. *Irf4*^{-/-} Mäuse konnten keine Th9-Zellen bilden und entwickelten keine schweren Symptome in Asthmodellen (Soroosh and Doherty, 2009; Staudt et al., 2010).

Eine weitere Gruppe der durch IRF4 beeinflussten Th-Zellen sind die Th17-Zellen. Th17-Zellen zeichnen sich durch die Produktion der Zytokine IL-17A, IL-17F und IL-22 aus und spielen eine Rolle in der Immunantwort gegen extrazelluläre Pathogene. Sie sind aber auch an der Entstehung verschiedener Autoimmunerkrankungen beteiligt. IRF4 ist essentiell für die Differenzierung von Th17-Zellen; als Folge hiervon zeigen *Irf4*^{-/-}Mäuse einen milden Verlauf in von Th17-Zellen-abhängigen Autoimmunmodellen (Biswas et al., 2010; Brustle et al., 2007; Hemdan et al., 2010; Huber et al., 2008; Lech et al., 2011; Mudter et al., 2011).

Eine besondere Subpopulation der CD4⁺T-Zellen sind die Treg. Diese Zellen unterdrücken überschießende Immunantworten und verhindern die Entstehung von Autoimmunität. Der Schlüsseltranskriptionsfaktor der Treg-Zellen ist Foxp3. Die

Funktion der Foxp3⁺Treg-Zellen scheint in *Irf4*^{-/-}Mäusen fehlreguliert zu sein. Zheng et al. haben berichtet, dass die IRF4-Expression den Treg-Zellen ermöglicht, die Th2-Immunantwort zu supprimieren. *Irf4*-knock out in Treg-Zellen hatte entsprechend eine Fehlregulation der Th2-Immunantwort und der Produktion von IL-4-abhängigen Antikörpern (IgG1 und IgE) sowie eine Plasmazellinfiltration in Speicheldrüse, Nieren und Magen zur Folge. Im Gegensatz dazu waren bei *FoxP3*^{-/-}Mäusen vor allem Infiltrate aus Makrophagen, Lymphozyten und Monozyten dominant vorhanden (Zheng et al., 2009). IRF4 scheint also in Treg-Zellen besonders für die effiziente Unterdrückung der Th2-Immunantworten zur Verfügung zu stehen. *Irf4*^{-/-}Treg-Zellen können außerdem kein Blimp-1 exprimieren und somit nicht zu Effektor-Tregs differenzieren. Die Transkription weiterer Effektormoleküle von Tregs, wie zum Beispiel IL-10 und Granzym B, ist in *Irf4*^{-/-}Tregs ebenfalls reduziert (Brustle et al., 2007; Cretney et al., 2011; Huber et al., 2008).

1.3.3.2.2.3 B-Zellen

IRF4 ist ebenfalls ein wichtiger Transkriptionsfaktor in der Reifung der immunkompetenten B-Zellen sowie in deren Differenzierung zu Plasmazellen.

Während der prä-B-Zellentwicklung fördert IRF4 die Neuordnung und Transkription der Ig-leichten Ketten, die sich mit den gebildeten schweren Ketten paaren, so dass es zur Oberflächenexpression des B-Zellrezeptors kommt (Johnson et al., 2008). IRF8 scheint in diesem Vorgang mit IRF4 zu kooperieren, weil *Irf4*^{-/-}*Irf8*^{-/-} Mäuse die B-Zellumwandlung vom prä-B-Zell- zum unreifen B-Zell-Stadium nicht erzeugen, welches eine stark verminderte Zahl der unreifen B-Zellen im Knochenmark zur Folge hat (Lu et al., 2003). IRF4 und IRF8 induzieren zusammenwirkend die Transkription und Rekombination der Ig-leichten Kette, sodass das *Rag*-Gen hochreguliert und die Differenzierung der prä-B-Zellen sichergestellt wird.

Darüber hinaus sind IRF4 und IRF8 in der späteren B-Zellreaktion des Keimzentrums und in der Differenzierung zu Plasmazellen von entscheidender Bedeutung, wobei sie sich hier entgegenwirken. Mäuse, in denen das *Irf4*-Gen in B-Zellen des Keimzentrums deletiert war, wiesen einen mangelnden Klassenwechsel der Immunoglobulin-Isotypen auf, da IRF4 den für den Klassenwechsel wichtigen Transkriptionsfaktor AID (*activation induced cytidine deaminase*) induziert (Klein et al., 2006). Carotta et al. publizierten, dass IRF8 zusammen mit PU.1 dem IRF4 entgegenwirkte, da es die

Expression von BCL-6 und PAX (*paired box*) -5 fördert und AID und Blimp-1 supprimiert. Die konzentrationsabhängige Konkurrenz zwischen IRF4 und IRF8 war also ein wichtiger Faktor für die terminale B-Zelldifferenzierung (Carotta et al., 2014). Auch andere Studien belegen, dass IRF4 und 8 die Expression von Transkriptionsfaktoren wie BCL-6, AID und Blimp-1 regulieren und dadurch die Reaktion des Keimzentrums und die Generation der Plasmazellen kontrolliert werden, wobei IRF4 die Expression von BCL-6 unterbindet und von Blimp-1 hochreguliert (Lu R. 2008). IRF4 ist auch für die Differenzierung derjenigen Th-Zellsubpopulation (Tfh) wichtig, die im Keimzentrum lokalisiert ist und dort die Entstehung hochaffiner B-Zellen begünstigt (Bollig et al., 2012). Außerdem verringert IRF4 die Größe der Marginalzone und die Akkumulation der B-Zellen in dieser Zone durch Entgegenwirkung des NOTCH2 Signalwegs (Simonetti et al., 2013). In B-Zellen interagiert IRF4 mit Transkriptionsfaktoren der Ets-Familie (PU.1/Spi-B) im Rahmen der Bindung an EICE (*ETS-IRF composite elements*) -Motive der DNA.

Zusammengenommen deuten die bisherigen Studien auf eine Funktion von IRF4 als eine Art Schlüsselregulator für Zellen des adaptiven Immunsystems hin. Dabei wird seine Bindung an die DNA nicht nur durch die exklusive Expression in Immunzellen, sondern auch durch die Kooperation mit anderen Transkriptionsfaktoren reguliert.

1.3.3.2.2.4 IRF4 als Onkogen oder Tumorsuppressor

Die Rolle von IRF4 in der Onkologie ist umstritten.

Es wurde nachgewiesen, dass die als t(6;14)(p25;q32) bezeichnete Translokation des *IRF4*-Gens zu dem *IGH* enhancer Locus mit der Pathogenese des MM (*multiple myeloma*) zusammenhängt (Natkunam et al., 2001). Wegen seiner Rolle in der Onkogenese des MM wurde IRF4 daher früher MUM (*multiple myeloma oncogene*) 1 genannt.

Die Überexpression von IRF4 als Folge der Translokation war nicht nur in MM (Iida et al., 1997), sondern auch in LPL (*lymphoplasmocytic lymphoma*) (Roberts et al., 2013) und DLBCL (*diffuse large B-cell lymphoma*) (Tsuboi et al., 2000) zu identifizieren. Darüber hinaus korrelierte die Überexpression von IRF4 in CLL (*chronic lymphoid leukemia*) mit einer schlechten Prognose (Ito et al., 2002).

Diese Studien zeigen, dass IRF4 als Onkoprotein wirkt und mit einer schlechten Prognose des Tumors einhergeht. Daneben zeigen aber andere Belege, dass die Expression von IRF4 in einigen myeloiden und in frühen B-lymphoiden Tumoren herunterreguliert wird und IRF4 dort tumorsuppressiv fungiert (Acquaviva et al., 2008). In den CML-Patienten war der Level der Expression von IRF4 niedrig und die Patienten mit niedriger IRF4 Expression sprachen auf die Therapie schlecht an (Schmidt et al., 2000).

Diese Daten zeigen, dass IRF4 wahrscheinlich unterschiedliche Funktionen in verschiedenen Zelltypen hat. Weitere Untersuchungen von Mechanismen, durch die IRF4 als Onkogen oder als Tumorsuppressor fungiert, würden für die Behandlung von Tumoren, die von IRF4 verursacht werden, möglicherweise von großer Bedeutung sein.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Teil I

In früheren Publikationen wurde gezeigt, dass der Transkriptionsfaktor IRF4 am C-terminalen Ende eine autoinhibitorische Domäne mit der Länge von 30 Aminosäuren enthält. Trotz dieser Erkenntnis gab es bisher keine Versuche um zu klären, ob diese Domäne die biologischen Funktionen von IRF4 beeinflusst. Als hämatopoietischer Transkriptionsfaktor wird IRF4 in Immunzellen exprimiert und induziert die Differenzierung der verschiedenen T-Zellsubpopulationen.

Ein Ziel dieser Arbeit war daher, den biologischen Effekt der autoinhibitorischen Domäne des IRF4 in der Differenzierung der T-Zellsubpopulationen (Th/c2, Th/c9, Th/c17) zu untersuchen. Hierfür wurden Mutationen in IRF4 generiert und über retrovirale Transduktion in *irf4*^{-/-} T-Zellen überexprimiert.

Teil II

IRF4-Promotor- und IRF4-Partnertranskriptionsfaktor-Interaktionen sind das bekannte Modell der IRF4 Wirkung, wobei die DBD von IRF4 für die Wechselwirkung mit dem Promotor zuständig ist, während die RD mit dem anderen Transkriptionsfaktor im Kontakt steht. Frühere Studien lassen die Hypothese zu, dass die Interaktion mit anderen Partnertranskriptionsfaktoren nicht immer über dieselbe Stelle der RD

vermittelt wird, sondern unterschiedliche Stellen für die Interaktion verantwortlich sind, je nachdem, mit welchem Faktor IRF4 in Verbindung steht. Dies könnte erklären, wie IRF4 die unterschiedlichen T-Zelldifferenzierungen reguliert, nämlich durch unterschiedlich lokalisierte Interaktionen mit anderen Faktoren. Dies könnte eine Möglichkeit eröffnen, die einzelne T-Zelldifferenzierung spezifisch durch die Modifikation der IRF4 Struktur zu blockieren. Eine hier möglicherweise besonders interessante Region ist die α -Helix, welche auf die autoinhibitorische Region in IRF4 folgt. Im zweiten Teil der Arbeit sollten daher IRF4 Mutanten generiert werden, die genau im Bereich dieser α -Helix lokalisiert sind. Erneut sollte die Funktion dieser Mutanten in *irf4*^{-/-} T-Zellen nach retroviraler Überexpression im Zentrum stehen.

2 Material

2.1 Mausstämme

Für die Überprüfung von Effekten der verschiedenen IRF4 Mutanten wurden *Irf4*^{-/-} (Mitrucker et al., 1997) und *Irf4*^{+/-} (Heterozygot) Mäuse mit dem genetischen Hintergrund von C57BL/6 verwendet. Alle Mäuse waren 3-6 Monate alt und ihre Zellen wurden *in vitro* geschlechtsunabhängig im Experiment verwendet.

2.2 Plasmide und Vektoren

2.2.1 pMIG-IRF4

Bei dem pMIG-IRF4 Plasmid handelt es sich um einen retroviralen Vektor, der neben dem *Ampicillin-Resistenz-Gen* und *Ori* (der Startpunkt der Replikation vom Plasmid) auch GFP (*Green fluorescence protein*) sowie das *Irf4*-Gen kodiert.

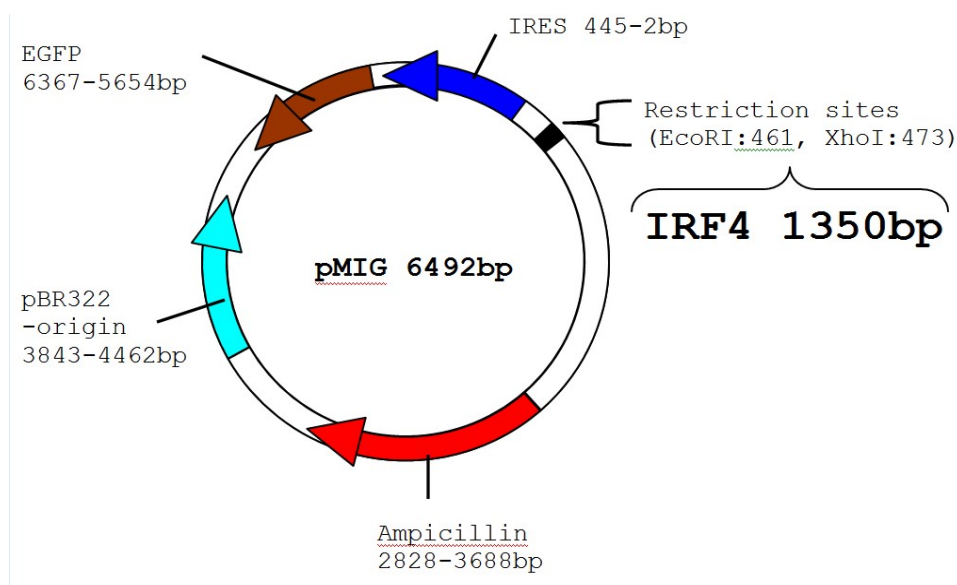


Abbildung 3. Schematische Darstellung des Vektors pMIG-IRF4

2.2.2 pCGP und pEco

Die beiden Plasmide pCGP und pEco kodieren die Verpackungsproteine von Retroviren, die für die Formation der Viren und die Infektion von Zellen durch diese Viren erforderlich sind. Nach gleichzeitiger Transfektion von pEco und pCGP erfolgt die Formation der infektiösen Retroviren. Der Zusatz von pMIG-IRF4 generiert Viren, die das *Irf4*-Gen mit eingebaut haben.

2.3 Bakterienklonierungsstamm

Bei dem Klonierungsstamm DH10B handelt es sich um *E.coli* Zellen, die für die elektrische und chemische Transformation häufig angewendet werden.

<i>E.coli</i>	Genotyp/Phänotyp	Herkunft
DH10B	F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 endA1 araD139 Δ (ara, leu)7697 galU galK λ - rpsL nupG	Invitrogen

2.4 HEK-Zellen

Die HEK-Zelllinie ist eine humane Zelllinie, die als Transformationsprodukt einer menschlichen embryonalen Nierenzelle mit DNA-Teilen des menschlichen *Adenovirus* 5 geschaffen wurde.

Um Retrovirenpartikel mit den *Irf4* oder *Irf4*-Mutantengenen zu produzieren, wurde diese Zelllinie als Wirt verwendet.

2.5 Geräte und Laborzubehör

Gerät/Laborzubehör (Typen)	Hersteller
Analysewaagen	Sartorius
Biosphere plus Safeseal Microtubes	SARSTEDT
Blotmodul	Criterion TM Blotter
Brutschrank	HERAcell240i
Chemilumineszenz System (MicroChemi2.0)	Biostep
FACS (Calibur)	BD
FACS Röhrchen	Sarstedt

Gel Imaging System (Gel IX Imager)	Intas Science Imaging System
Heizblock	Roth
Lichtmikroskop (BX51)	Olympus
Magnetrührer	IKA
Magnetständer (MagneSphere)	Promega
Mikroplatten Leser (Fluostar Omega)	BMG LABTECH
Neubauer- Zählkammer	Brandt
PCR-Maschine	Biometra
Petrischalen 10cm Durchmesser für Agar (Bakterien)-unbeschichtet	Grainer und Sarstedt
Petrischalen 10cm Durchmesser für Zellkultur -beschichtet	BD und Nunc
pH-Meter	Inolab
Pipetten	Eppendorf und Gilson
Pipetenspitzen Blau (100-1000 µl), gelb (10-100 µl), weiß (1-10 µl)	Greiner bio-one
Pipetenspitzen mit Filter 1-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl	Starlab
Reaktionsgefäße 50 ml, 15 ml, 2,0 ml, 1,5 ml, 0,5 ml, 0,2 ml	Eppendorf und Grainer
Rotator (Bio RS-24)	BIOSAN
Schüttelinkubator	New Brunswick Scientific Co.
SDS-Gelelektrophoresekammer (Mini-PROTEAN™ System)	Biorad
Sicherheitswerkbank	Heraeus
Spektrophotometer Nanodrop ND-1000	Peqlab
Spannungsquelle (Power Pac 1000)	Biorad
Spritzen 1 ml	BD
StepOnePlus Real-time PCR-System	Applied Biosystems
Sterilfilter mit der Porengröße 0,22µm	Millex-GS
Sterillbank (HERAsafe)	Heraeus
SuperSignal®West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Scientific
Vortexer (Minishaker MS2)	Ika
Wasserbad	Memmert
Zellkulturflaschen 50 ml, 250 ml	Grainer
Zellkulturplatten (48/96/6 well Flachboden-Platten)	Grainer
Zentrifugen: Biofuge Stratos (Rotor 3331), Multifuge 1L-R (Rotor 75002000) Megafuge 1.0R (Rotor 2704)	Heraeus-Thermo Scientific

2.6 Chemikalien und Biochemikalien

Substanz	Firma
100× Aminosäuren non Essential	PAA
2-Mercapthoethanol	Sigma-Aldrich
Agar-Agar	Oxoid
Agarose	Biozym
AKP-Streptavidin	BD Pharmingen
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich
Ampicillin	Sigma-Aldrich
β-Mercaptoethanol (ME)	Sigma-Aldrich
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich
BSA 100×	New England Biolabs
Brefeldin A	Sigma-Aldrich
Diethanolamin	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
DMEM-Medium	Sigma-Aldrich
EDTA	Sigma-Aldrich
Erythrozyten-Lysispuffer	Sigma-Aldrich
Ethanol absolut	Sigma-Aldrich
Ethylendiamintetraacetat (EDTA) 0,5M pH 8,0	Promega
Fast SYBR TM Green Master Mix	Applied Biosystems
FCS (steril)	Sigma-Aldrich
Fixation/Permeabilization Diluent/Concentrate	eBioscience
Formaldehyd 36,5 %	Sigma-Aldrich
Glycin	Roth
H ₂ O	Braun
Hank's Salz-Trockensubstanz (BSS)	Biochrom AG
HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethan sulfonsäure)	Roth
ImmunoCruz TM Western Blotting Luminol Reagent	SantaCruz
Ionomycin	Sigma-Aldrich
Isopropanol	Sigma-Aldrich
Kalziumchlorid (CaCl ₂ *2H ₂ O)	Merck
LB-Broth-Base	Gibco
L-Glutamin	Biochrom
Magnesium Chlorid·6H ₂ O	Sigma-Aldrich
Methanol	Roth
Natriumazid (NaN ₃)	Sigma-Aldrich
NaCl-Lösung	Braun
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich
Natriumfluorid (NaF)	Merck
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merk
Natriumorthovanadat (Na ₃ VO ₄)	Sigma-Aldrich

NaOH	Roth
Nicht-essentielle Aminosäuren (NEAS) 100×	PAA, Sigma-Aldrich
N,N,N',N' – Tetramethylethane-1,2- diamine (TEMED)	Sigma-Aldrich
PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa	Thermo Scientific
Phorbol 12- Myristate 13-Acetate (PMA)	Sigma-Aldrich
PBS	Biochrom AG
Pierce BCA Protein Assay A, B	Thermo Scientific
Penicillin	Biochrom AG
p-Nitrophenyl Phosphate (pNPP)	Sigma-Aldrich
Polybrene	Sigma-Aldrich
PVDF Membran	Roche
RIPA Buffer (10×	Sigma-Aldrich
Rotiphorese™ Gel30 (Polyacrylamid)	Roth
RPMI-1640 Medium	Sigma-Aldrich
Rubidiumchlorid (RbCl)	Fluka
Saponin	Sigma-Aldrich
Streptavidin	Promega
Saponin	Sigma-Aldrich
Streptomycin Sulfat	Biochrom Ag
Tris – HCl	Roth
Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Tris - Base)	Acros Organics
Trypanblau	Gibco BRL
Whatmanpapier	Whatman-Ltd.
Wasser (steril)	Braun Ag

2.7 Medien und Puffer

2.7.1 LB (*Luria-Bertani*) -Flüssig-Medium

Pro Liter anzusetzendem Medium wurden 20 g LB Broth Base in destilliertem Wasser gelöst und anschließend autoklaviert (121 °C, 15 min). Vor dem Animpfen von Bakterienkulturen wurde der benötigte Selektionsmarker Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugefügt.

2.7.2 LB (*Luria-Bertani*) -Agar-Festmedium

In einer Endkonzentration von 15 g/l wurde dem LB-Medium LB-Agar hinzugefügt. Im

Anschluss an das Autoklavieren und nach Abkühlen auf ca. 50 °C wurde dem Medium das Antibiotikum Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugegeben und die Mischung in Petrischalen gegossen.

2.7.3 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)

Für 1 l DMEM-Medium wurden nach Herstellerangaben 13,5 g DMEM-Pulver mit 60 mg Penicillin, 0,1 g Streptomycin Sulfat, 1,4 g NaHCO₃ und 2,4 g HEPES gemischt, in destilliertem Wasser gelöst und mit 5 ml 2-Mercaptoethanol (10 mM Stammlösung) versetzt. Der pH-Wert des Mediums wurde auf pH 7,2 eingestellt, das Volumen auf 1 l mit H₂O aufgefüllt. Das Medium wurde anschließend sterilfiltriert. Vor Gebrauch des Mediums wurden 1 % (v/v) einer 200 mM L-Glutamin-Stammlösung und 10 % (v/v) FCS zugefügt.

2.7.4 PBS (Phosphate Buffered Saline) - Puffer

Es wurden 95,5g PBS-Pulver (ohne Ca²⁺/Mg²⁺ - Ionen) für 10 l Gesamtvolumen in destilliertem Wasser gelöst, der pH-Wert auf pH 7,2 gestellt und die Lösung sterilfiltriert.

2.7.5 FCS (fetal calf serum)

Um das Komplement im FCS zu inaktivieren, wurde dieses für 45 min bei 56 °C erhitzt, anschließend in 50 ml Reaktionsgefäße aliquotiert und bei 4 °C gelagert.

2.7.6 RPMI-1640 Medium

Vor Gebrauch wurden zum kommerziell erhältlichen RPMI-1640 Medium (500 ml) 10 % (v/v) FCS, 2 mM L-Glutamin, 60 mg/l Penicillin, 100 mg/l Streptomycin, 1x (v/v) non essential Aminosäuren und 0,05 mM 2-Mercaptoethanol hinzugefügt.

2.7.7 BSS (Balanced Salt Solution)

Es wurden 99 g Hank's Salz- Trockensubstanz (ohne NaHCO_3) zusammen mit 0,6 g Penicillin G, 1 g Streptomycin Sulfat, 14,25 g NaHCO_3 , 23,83 g HEPES in 10 l H_2O dest. gelöst, der pH-Wert auf pH 7,2 eingestellt und die Lösung sterilfiltriert.

2.7.8 Saponin Puffer

0,3% (w/v) Saponin und 2% FCS (v/v) wurden in PBS Lösung gelöst und sterilfiltriert.

2.7.9 MACS Puffer

0,1% (w/v) BSA und 2mM EDTA wurden in PBS Lösung gelöst und sterilfiltriert.

2.7.10 2×HBS Puffer

1,6g (280mM) NaCl, 0,021g (1,18mM) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ und 1,2g (50mM) HEPES wurden in 100ml H_2O gelöst und der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,05 eingestellt. Danach wurde die Lösung sterilfiltriert und bei 4°C gelagert.

2.7.11 Puffer für Western Blot

Puffer	Zusammensetzung
Waschpuffer	5 M NaCl 1 M Tris-HCl (pH 7,5) 0,05 % Tween20 (v/v) in 1 l Aqua dest.
Blockpuffer	5 % BSA (w/v) in Waschpuffer
Ladepuffer 4×	0,8 ml Glyzerol 1,0 ml Tris-HCl (0,5 M, pH 8,3) 1,6 ml SDS (10%) 0,4 ml Bromphenolblau (1 %) 0,4 ml 2-Mercaptoethanol (1 %) 3,8 ml Aqua dest.
Laufpuffer	200 mM Glycin 25 mM Tris-Base 0,1 % SDS (w/v)
Transferpuffer	200 mM Glycin

	25 mM Tris-HCl pH 8,8 0,1 % SDS (w/v) 20 % Methanol
--	-----------------------------------------------------------

2.7.12 Puffer für ELISA

Puffer	Zusammensetzung
ELISA Coating Puffer	0,1 M NaHCO ₃ pH 8,2
Waschpuffer	0,05 % Tween 20 (v/v) in PBS-Puffer
Blockpuffer	3 % BSA (w/v) in PBS-Puffer
1 M Diethanolamin-Puffer	400 mg MgCl ₂ ·6H ₂ O 48,5 ml Diethanolamin ad. bis 500 ml H ₂ O 1h rühren lassen, pH 9,8 einstellen

2.8 Primer

Die Primer, die zur Sequenzierung von Mutanten verwendet wurden, sind folgende:

Primer	Sequenz
pBabe	5'- CTT TAT CCA GCC CTC AC- 3'
IRES	5'- CCT CAC ATT GCC AAA AGA CG- 3'
IRF4 242 for	5'- TCC GAG AAG GGA TCG ACA A- 3'
IRF4 459 rev	5'- AGC CAT AAG GTG CTG TCA TGG- 3'

Die für die Generierung von Mutanten verwendeten Primer werden in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Mutanten	Forward Primer	Reverse Primer
d421-450	5' - TAC TTT GCT CAA CAA AAC TGA GAA TTC CGC CCC CCC -3'	5' - GGG GGG GCG GAA TTC TCA GTT TTG TTG AGC AAA GTA - 3'
d411-450	5' - TGG AAC CTC TGC TAG CCT GAG AAT TCC GCC CCC CCC -3'	5' - GGG GGG GGC GGA ATT CTC AGG CTA GCA GAG GTT CCA - 3'
d416-420	5' - CTA GCC AGA CAA CTG TAT TAC ACT GGA CAT TTC CTG AGG GGC - 3'	5' - GCC CCT CAG GAA ATG TCC AGT GTA ATA CAG TTG TCT GGC TAG - 3'
d411	5' - CAT GTG GAA CCT CTG CTA GCC CAA CTG TAT TAC TTT GCT CAA -3'	5' - TTG AGC AAA GTA ATA CAG TTG GGC TAG CAG AGG TTC CAC ATG - 3'
d412	5' - GTG GAA CCT CTG CTA GCC AGA CTG TAT TAC TTT GCT CAA CAA - 3'	5' - TTG TTG AGC AAA GTA ATA CAG TCT GGC TAG CAG AGG TTC CAC - 3'

d413	5' - GAA CCT CTG CTA GCC AGA CAA TAT TAC TTT GCT CAA CAA AAC - 3'	5' - GTT TTG TTG AGC AAA GTA ATA TTG TCT GGC TAG CAG AGG TTC - 3'
d414-415	5' - CCT CTG CTA GCC AGA CAA CTG TTT GCT CAA CAA AAC ACT GGA - 3'	5' - TCC AGT GTT TTG TTG AGC AAA CAG TTG TCT GGC TAG CAG AGG - 3'
d2-420	5' - GGA GGA GGT CCG CAC GCG TCA TGA CTG GAC ATT TCC TGA GGG GCT A - 3'	5' - TAG CCC CTC AGG AAA TGT CCA GTC ATG ACG CGT GCG GAC CTC CTC C - 3'
R411P	5' - ATG TGG AAC CTC TGC TAG CCC CAC AAC TGT ATT ACT TTG CTC - 3'	5' - GAG CAA AGT AAT ACA GTT GTG GGG CTA GCA GAG GTT CCA CAT - 3'
P411-412	5' - TGG AAC CTC TGC TAG CCC CAC CAC TGT ATT ACT TTG CTC AAC A - 3'	5' - TGT TGA GCA AAG TAA TAC AGT GGT GGG GCT AGC AGA GGT TCC A - 3'
P411-413	5' - GAA CCT CTG CTA GCC CCA CCA CCG TAT TAC TTT GCT CAA CAA - 3'	5' - TTG TTG AGC AAA GTA ATA CGG TGG TGG GGC TAG CAG AGG TTC - 3'
R411A	5' - ATG TGG AAC CTC TGC TAG CCG CGC AAC TGT ATT ACT TTG CTC A - 3'	5' - TGA GCA AAG TAA TAC AGT TGC GCG GCT AGC AGA GGT TCC ACA T - 3'
A412-413	5' - GAA CCT CTG CTA GCC AGA GCA GCG TAT TAC TTT GCT CAA CAA - 3'	5' - TTG TTG AGC AAA GTA ATA CGC TGC TCT GGC TAG CAG AGG TTC - 3'
A411-413	5' - TGT GGA ACC TCT GCT AGC CGC AGC AGC GTA TTA CTT TGC TCA - 3'	5' - TGA GCA AAG TAA TAC GCT GCT GCG GCT AGC AGA GGT TCC ACA - 3'
A414-415	5' - CTG CTA GCC AGA CAA CTG GCT GCC TTT GCT CAA CAA AAC ACT - 3'	5' - AGT GTT TTG TTG AGC AAA GGC AGC CAG TTG TCT GGC TAG CAG - 3'
R411K	5' - ATG TGG AAC CTC TGC TAG CCA AAC AAC TGT ATT ACT TTG CTC A - 3'	5' - TGA GCA AAG TAA TAC AGT TGT TTG GCT AGC AGA GGT TCC ACA T - 3'
R411E	5' - ATG TGG AAC CTC TGC TAG CCG AACAAC TGT ATT ACT TTG CTC - 3'	5' - GAG CAA AGT AAT ACA GTT GTT CGG CTA GCA GAG GTT CCA CAT - 3'

Die für qPCR verwendeten Primer werden in der folgenden Tabelle zusammengefasst

Primer	Sequenz
HPRT for	5' - CTG GTG AAA AGG ACC TCT CG - 3'
HRPT rev	5' - TGA AGT ACT CAT TAT AGT CAA GGG CA - 3'
ROR γ t for	5' - TTT GGA ACT GGC TTT CCA TC - 3'
ROR γ t rev	5' - AAG ATC TGC AGC TTT TCC ACA - 3'

2.9 Kits

Bezeichnung	Firma
Nucleo Bond Extra Maxi Kit	Macherey & Nagel
Quick change®II Site Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies
CD4 ⁺ CD62L ⁺ T Cell Isolation Kit mouse	Miltenyi Biotec
High Pure RNA Isolation Kit	Roche-applied-science
Mouse IL-13 DuoSet® ELISA	RnDSystems
Mouse IL-17 DuoSet® ELISA	RnDSystems
Mouse IL-17F (homodimer) ELISA Ready-SET-Go!®	eBioscience
Mouse IL-21 ELISA Ready-SET-Go!®	eBioscience
Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Scientific

2.10 Antikörper, Zytokine und Fluoreszenzfarbstoffe

Antikörper/Zytokine/Farbstoffe (Klon)	Hersteller/Firma
---------------------------------------	------------------

1. Allgemeine

Anti-CD3 (Klon 145.2c-11)	Aufreinigung in der Arbeitsgruppe
Anti-CD28 (Klon 37.51)	Aufreinigung in der Arbeitsgruppe
Anti-Maus IFN γ (Klon XMG 1.2)	Aufreinigung in der Arbeitsgruppe
Anti-Maus IL-4 (Klon 11B11)	Aufreinigung in der Arbeitsgruppe
r(rekombinantes)h(humanes) IL-2 (PROLEUKIN®S)	Novartis
rm(murines) IL-4	PEPRO TECH
rm IL-6	PEPRO TECH
rhTGF- β -1	PEPRO TECH
Kombi anti-FITC Biotin/Streptavidin	Aufbereitung in der Arbeitsgruppe
Beads Biotinyliert	Aufbereitung in der Arbeitsgruppe

2. FACS Antikörper

Ratte anti-Maus CD4-PerCP (Klon RM4-5)	BioLegend
Ratte anti-Maus CD8a-FITC (Klon 53-6.7)	eBioscience
Ratte anti-Maus CD8a-V500 (Klon 53-6.7)	BioHorizon
Ratte anti-Maus CD62L-Alexa Fluor®700 (Klon MEL-14)	BD Phamingen
Ratte anti-Maus CD44-APC-Cy TM 7 (Klon IM7)	BD Phamingen
Ratte anti-Maus CD11b-FITC (Klon M1/70)	eBioscience
Ratte anti-Maus CD11c-FITC (Klon N418)	eBioscience
Ratte anti-Human/Maus CD45R(B220)-FITC (Klon RA3-6B2)	eBioscience
Ratte anti-Maus Ter-119-FITC (Klon TER-119)	eBioscience
Ratte anti-Maus CD49b-FITC (Klon DX5)	eBioscience

Ratte anti-Maus IL-9-APC (Klon RM9A4)	BioLegend
Ratte anti-Maus IL-10-PE (Klon JES5-16E3)	eBioscience
Ratte anti-Maus IL-13-PE (Klon eBio13A)	eBioscience
Ratte anti-Maus IL-17a-APC (Klon eBio17B7)	eBioscience
Ratte IgG1 κ isotype Ctrl. -APC (Klon RTK2071)	eBioscience
Ratte IgG2a κ isotype Ctrl.-PE (Klon eBR2a)	eBioscience

3. WB Antikörper

3.1. Primär-Antikörper

IRF4 (Klon F-4) mouse monoclonal IgG2a sc-48338	SantaCruz
Monoclonal anti- β -Aktin (Klon AC-15) mouse IgG1	Sigma-Aldrich

3.2. Sekundär-Antikörper

Goat anti-rabbit IgG-HRP sc-2004	SantaCruz
Donkey anti-goat IgG-HRP sc-2020	SantaCruz
Goat anti-mouse IgG-HRP sc-2055	SantaCruz

4. ELISA Antikörper

4.1. Capture-Antikörper

Purified Rat Anti-Mouse IL-4 (Klon BVD4-1D11)	BD Pharmingen
Purified Rat Anti-Mouse/Anti-Human IL-5 (Klon TRFK5)	BD Pharmingen
Purified Rat Anti-Mouse IL-9 (Klon	BD Pharmingen

4.2. Detektionsantikörper

Biotin Rat Anti-Mouse IL-4 (Klon BVD6-24G2)	BD Pharmingen
Biotin Rat Anti-Mouse IL-5 (Klon TRFK4)	BD Pharmingen
Biotin Hamster Anti-Mouse IL-9 (Klon D9302C12)	BD Pharmingen

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Mutagenese mittels Quikchange® II Site Directed Mutagenesis Kit

Um die verschiedenen Deletions-/Punkt-Mutanten von IRF4 zu generieren, wurde der Quikchange® II Site Directed Mutagenesis Kit verwendet, dessen Methode auf der herkömmlichen PCR beruht, und alle Reagenzien wurden nach Angabe des Herstellers pipettiert. Abweichend davon wurde *Ultra Phusion® Polymerase* als Enzym eingesetzt. In den folgenden Tabellen werden der hierbei verwendete PCR-Ansatz und der Thermozyklus dargestellt.

Konzentration/Volumen	Reagenzien
5µl(10x)	Reaktionspuffer
150ng	Forward Primer
150ng	Reverse Primer
50ng	Template-DNA
1µl	dNTP
3µl	Quik Solution
1µl	<i>Ultra Phusion® Polymerase</i>
Bis zu 50µl	ddH ₂ O

Wiederholung	Temperatur	Dauer
1×	95°C	10s
18×	95°C	30s
	55°C	30s
	72°C	8min
1×	72°C	5min
	4°C	-

Nach der PCR-Reaktion wurde das Produkt mit dem Restriktionsenzym *DpnI* (im Kit vorhanden) behandelt, welches die methylierten Nukleinsäuren spezifisch erkennt und abbaut, um die aus den Bakterien stammenden DNA-Template zu eliminieren, da Plasmide im verwendeten *E.coli* Stamm durch die Methylasen methyliert wurden.

3.1.2 Herstellung der chemisch kompetenten *E.coli* Zellen

Für die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen wurden zunächst die Stammkulturen von *E. coli* (DH10B) Zellen in 3 ml LB-Medium (ohne Zusatz von Antibiotikum) über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator kultiviert. Am darauffolgenden Tag wurden 100 ml LB-Medium mit 500 µl dieser Vorkultur beimpft und ebenfalls bei 37 °C im Schüttelinkubator bis zu einer optischen Dichte (OD) von 0,6 - 0,7 (oder 3,3 McFa) inkubiert. Die Bakterien wurden schließlich pelletiert (3000 rpm, 4 °C, 10 min; Multifuge 1L-R; Rotor 75002000) und in 33 ml eiskaltem RFI-Puffer resuspendiert. Nach einer 15minütigen Inkubation auf Eis wurde die Bakteriensuspension erneut zentrifugiert (3000 rpm, 4 °C, 10 min), und das Pellet wurde in 5 ml RFII-Puffer resuspendiert und abermals für 15 min auf Eis inkubiert. Abschließend wurden die kompetenten Zellen in Aliquots à 100 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

RFI-Puffer	12 g RbCl 9,9 g MnCl ₂ * 4 H ₂ O 30 ml Kaliumacetat (1 M, pH 7,5) 1,5 g CaCl * 2 H ₂ O 150 g Glycerin ad 1000ml H ₂ O _{dest.} → pH 5,8 einstellen, sterilfiltrieren
RFII-Puffer	20 ml MOPS (0,5 M, pH 6,8) 1,2 g RbCl 11 g CaCl ₂ * 2H ₂ O 150 g Glycerin ad 1000 ml H ₂ O _{dest.} → pH 5,8 einstellen, sterilfiltrieren

3.1.3 Hitze-Schock-Transformation

Bei der Transformation handelt es sich um die Einführung des Vektors in kompetente *E.coli*, - Bakterien, wobei der Vektor sich zusammen mit dem Replikationszyklus der Wirtszelle vermehrt. Dieser Vorgang ist bei der Klonierung für die Konservierung und Vermehrung des mit dem Zielgen verknüpften Vektors von großer Bedeutung.

Für die Transformation wurden die 100µl bei -80°C gelagerten, kompetenten *E.coli* (DH10B) Bakterien auf dem Eis aufgetaut. Danach wurde 2µl zu transformierendes PCR-Produkt auf die *E.coli* Zellen gegeben. Diese Mischung wurde 30 min auf dem Eis

gelagert und anschließend für 1,5 min auf dem Heizblock bei 42°C inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die Ansätze wieder für 5 min auf Eis gestellt und danach mit 900µl von dem auf 37°C vorgewärmten LB-Medium vermischt. Nun wurde diese Mischung im 37°C Raum auf dem Schüttler mit 180 rpm für 60 min inkubiert. Nach Zentrifugation (2000 rpm, 5 min) wurde das Bakterienpellet in 100 µl LB-Medium resuspendiert und die Bakterien wurden auf LB-Agar-Platten mit Ampicillin über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.1.4 Stammkultur Konservierung

Die *E.coli* Stammkultur, welche klonierte DNA-Fragmente enthält, sollte optimalerweise bei -80°C gelagert werden. Die Vorbereitung dafür läuft folgendermaßen ab: 900µl der Übernacht-Zellkultur werden mit 100µl DMSO gemischt und in Kryoröhrchen gefüllt. Diese Röhrchen werden im -80°C Gefrierschrank gelagert.

3.1.5 DNA Isolierung

Zur Isolierung der DNA aus *E.coli* zur Sequenzierung wurde die Methode der alkalischen Lyse angewandt. Zunächst wurden die Stammkulturen in 1,5 ml LB-Medium mit 1 µg/ml Ampicillin angeimpft und in 37 °C über Nacht kultiviert. Danach wurde diese Bakterienkultur zentrifugiert (2000 rpm, 5 min) und das Zellpellet in 150 µl H₂O resuspendiert. Die Bakterien wurden durch Zugabe von 150 µl 0,2 M NaOH/1 % SDS (w/v) lysiert und dann die Lösung mit 150 µl 3 M Kalziumacetat (pH 5,2) neutralisiert. Nach 15minütiger Zentrifugation (13,000 rpm, 10 min) wurde der klare Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend erfolgte die DNA-Fällung durch Zugabe eines 0,7-fachen Volumens an Isopropanol (13,000 rpm, 30 min) und ein Waschschriff mit 500 µl 70 % EtOH (13,000 rpm, 5 min). Nach Trocknen des Pelletes wurde die DNA in 50 µl H₂O mit 1 µl (5 µg/µl) RNase resuspendiert.

Um größere Mengen von Plasmid-DNA zu gewinnen, wurde das *Nucleo Bond Extra Maxi* Kit verwendet. Die Stammkulturen wurden in 300 ml LB mit 100 µg/ml Ampicillin angeimpft und bei 37 °C über Nacht bebrütet. Bei der Aufreinigung wurde nach der Vorschrift des Herstellers verfahren. Je nach Menge und Größe des DNA-Pellets wurde dieses in 500 µl - 1000 µl H₂O resuspendiert.

3.1.6 Konzentrationsbestimmung von RNA und DNA

Mithilfe des NanoDrops® (Spektrometer, Software: ND-1000-V3.3.0) wurde die Konzentration der DNA bzw. RNA photometrisch bei 260 nm bestimmt. Mit dem Quotienten der Absorptionswerte bei 260 nm/ 280 nm wurde die Reinheit der DNA bestimmt. Dabei wurde ein Wert zwischen 1,8 - 2,0 als optimal angesehen.

3.1.7 DNA Sequenzierung

Alle zu sequenzierenden DNA-Proben wurden zur Firma Seqlab (Göttingen) geschickt und die Ergebnisse waren online zu erhalten. Dafür wurden 1.2µg Vektor (800ng/µl) und 30pmol Primer (2pmol/µl) mit dem ddH₂O im 1,5ml Röhrchen gemischt und auf ein Endvolumen von 15µl gebracht. Die Proben wurden zusammen mit dem Bestellschein im transparenten Beutel verschickt. Die Vergleichbarkeit der Probensequenz mit publizierten Sequenzen wurde mittels Sequenzanalyseprogrammen (NCBI-Blast, Integrated DNA Technologies und Ape) überprüft.

3.1.8 qPCR

Um die Expression von Transkriptionsfaktoren zu erfassen, wurde die Menge der mRNA für diese Faktoren in mit IRF4 Mutanten infizierten CD4⁺ Zellen aus IRF4 KO-Mäusen nach der Differenzierung mittels qPCR quantifiziert.

3.1.8.1 Isolierung der mRNA-Proben

Nach der Differenzierung wurden 1,0 Mio. Zellen für 4 h mit 50 ng/ml PMA und 750 ng/ml Ionomycin restimuliert. Zellpellets und Überstände wurden durch Zentrifugation für 5 min mit 1,500 rpm getrennt und in separaten 1,5 ml low binding Reaktionsgefäßen gesammelt. Die Überstände wurden bei -20 °C gelagert und später für ELISAs verwendet. Die Zellpellets wurden für 10 min in 2000 rpm bei 4 °C mit PBS gewaschen. Danach wurden sie schnell im flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Nach dem Protokoll des Herstellers wurden die Zellpellets danach mit

dem RNA-Isolationskit (High Pure RNA Isolation Kit) verarbeitet. Zum Schluss wurde die RNA abweichend von dem Protokoll mit 40 µl statt 50 µl Elutions-Puffer eluiert.

3.1.8.2 cDNA Synthese

Bei der Herstellung von cDNA findet eine reverse Transkription (RT) der mRNA in cDNA statt. Hierbei dient die Nukleotid-Sequenzabfolge der mRNA als Vorlage. Sie wird durch das Enzym Reverse Transkriptase in die komplementäre DNA umgeschrieben.

11 µl RNA-Proben wurden hierzu mit 1 µl Oligo(dT)18-Primer gemischt, für 5 min im Thermocycler auf 65 °C erhitzt, um die RNA zu denaturieren und danach sofort auf Eis gekühlt. Im Anschluss wurden 8 µl RT-Mastermix (Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit) zugegeben, bestehend aus 4 µl 5x Reaction Buffer 1 µl Ribonuklease Inhibitor (20 U/µl), 2 µl dNTP mix (10 mM) und 1 µl Reverser Transkriptase. Die reverse Transkription wurde für 60 min bei 42 °C durchgeführt und anschließend für 5 min bei 70 °C gestoppt. Zum Schluss wurden die Proben mit 20 µl H₂O verdünnt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.1.8.3 PCR und Dateiauswertung

Mit der qPCR kann man die Menge der anfänglich vorhandenen DNA-Kopien eines Zielgens quantifizieren. Die Detektion des PCR-Produkts während der Amplifikation ist durch die Zugabe eines fluoreszierenden Moleküls, wie z.B. SYBR Green, möglich. Dies ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der unspezifisch an doppelsträngige DNA bindet und durch Anregung bei 498 nm Licht der Wellenlänge 522 nm emittiert. Dabei ist das Fluoreszenzsignal, das man bei jedem Reaktionszyklus erhält, proportional zur Menge an vorhandener DNA, d.h. je stärker das Fluoreszenzsignal ist, desto mehr PCR-Produkt (im Beispiel cDNA als Messwert für die ursprüngliche Menge an mRNA) ist in der Reaktion amplifiziert worden.

Die quantitative PCR von Transkriptionsfaktoren wurde mittels eines Real Time PCR Gerätes (StepOne) von Applied Biosystems durchgeführt.

Für die qPCR wurde pro Probe folgender Ansatz pipettiert:

cDNA	2 µl
Forward Primer	1 µl
Reverse Primer	1 µl
SyberGreen rmix	8 µl
Wasser	8 µl

Der PCR-Cycler wurde folgendermaßen programmiert:

95°C	3 min
95°C	10 s
60°C	30 s
95°C	1 min

Am Ende der Reaktion (nach ca 40 Zyklen) wurde eine Schmelzkurve aufgenommen, durch die man feststellen kann, ob bei der PCR-Reaktion tatsächlich nur ein Produkt amplifiziert wurde.

Im Anschluss an die PCR wurde in einem sogenannten Amplifikationsplot die Anzahl der Zyklen auf der x-Achse gegen die Fluoreszenzintensität auf der y-Achse aufgetragen. Dann wurde aus der Hintergrundfluoreszenz ein Schwellenwert für die Fluoreszenz der Proben berechnet. Der Zyklus, bei dem zum ersten Mal genug amplifiziertes Produkt vorhanden ist, um ein Fluoreszenzsignal zu erhalten, das über dem Schwellenwert liegt, wird als threshold cycle oder C_T bezeichnet. Damit können die im Ausgangsmaterial vorhandenen cDNA-Mengen in den verschiedenen Proben verglichen werden. Ist der C_T -Wert klein, dann sind nur wenige Zyklen notwendig, um den Schwellenwert zu überschreiten. Somit war eine größere Menge der Ziel-cDNA in der Probe vorhanden. Bei großen C_T -Werten ist die Anzahl der gesuchten cDNA-Kopien hingegen gering. Um sicherzustellen, dass bei allen Proben eine gleiche Ausgangsmenge an cDNA vorhanden ist, wurden die Daten zusätzlich auf ein Referenzgen (HPRT) normalisiert, welches in Zellen nicht reguliert und damit immer konstant vorhanden ist. Außerdem legte ich innerhalb der getesteten Proben einen Kalibrator fest, der als 1 definiert wird und in dieser Arbeit pGFP-transduzierte (siehe Ergebnisse) Zellen repräsentierte. Die Expression des Zielgens wurde schließlich als Zu- oder Abnahme relativ zum Kalibrator angegeben.

3.1.9 Western Blot

Um zu überprüfen, ob die Effekte der IRF4 Mutanten auf die T-Zelldifferenzierung nicht auf einer veränderten Proteinexpression basierten, wurde die Expression der verschiedenen Mutanten in den jeweilig verwendeten Zellen mit Western Blot detektiert und miteinander verglichen.

3.1.9.1 Herstellung von Proteinlysaten und Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Gewinnung der Proteine aus infizierten HEK-Zellen wurden diese nach dem Entfernen der 48-stündigen Virenüberstände (nach Transduktion; siehe unten) von der Zellkulturschale geerntet und 2 Mal mit kaltem PBS-Puffer bei 1700 rpm für 5 min gewaschen. Das Pellet wurde mit 100 µl eiskaltem RIPA-Puffer gemischt, resuspendiert und bei 13,000 rpm bei 4 °C für 10 min zentrifugiert. Da sich die Proteine nach der Zellyse im Überstand befinden, wurden diese vorsichtig abpipettiert, in neue Zentrifugenröhrchen überführt und sofort bei -80 °C eingefroren, wobei 10 µl für die Messung der Proteinkonzentration abgenommen wurden. Die Konzentrationsbestimmung der Proteine wurde mit Hilfe des BCA-Proteinassays von Pierce durchgeführt. Dabei wurde entsprechend dem Protokoll des Herstellers vorgegangen. Die Messung der Proben erfolgte mit dem Microplate Leser bei einer Wellenlänge von 540nm. Bei der Methode wurde BSA als Standard verwendet.

3.1.9.2 Herstellung des SDS - Polyacrylamidgels

Durch die SDS-PAGE (*Polyacrylamid-Gelelectrophoresis*) werden Proteine nach ihrem Molekulargewicht im elektrischen Feld aufgetrennt. In dieser Doktorarbeit wurde das mini PROTEAN Elektrophoresis System der Firma Biorad verwendet. Zunächst erfolgte das Gießen eines 10 %-igen Trenngels, welches mit Isopropanol überschichtet wurde. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde die Isopropanol-Schicht entfernt, das Sammelgel (4 %) über das Trenngel gegossen und ein Kamm eingefügt. Nach der Polymerisation des Sammelgels wurde der Kamm entfernt und die Geltasche mit dem Ladepuffer gespült.

In der folgenden Tabelle sind die Ansätze der im Experiment verwendeten Gele zu sehen:

	10 % iges Trenngel (5 ml)	5 % iges Sammelgel (2 ml)
H ₂ O	1,9 ml	1,4 ml
30 % acrylamide mix	1,7 ml	0,33 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	1,3 ml	-
1,0 M Tris (pH 6,8)	-	0,25 ml
10 % SDS	0,05 ml	0,02 ml
10 ammonium persulfate	0,05 ml	0,02 ml
TEMED	0,002 ml	0,002 ml

3.1.9.3 Gelelektrophorese

20 µg Protein enthaltende Proben wurden in 22,5 µl ddH₂O aufgenommen und mit 7,5 µl 4×Ladepuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Das Gel wurde im Elektrophoreseblock aufgebaut und in die mit Laufpuffer aufgefüllte Elektrophoresekammer eingesetzt. Die Geltaschen wurden mit 25 µl der vorbereiteten Proben und 4 µl Marker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder) beladen und die elektrophoretische Auftrennung mit der Stromstärke von 80 V im Sammelgel und 120 V im Trenngel durchgeführt. Nach dem Lauf erfolgte das Blotting der Proteine auf eine PVDF-Membran.

3.1.9.4 Western Blot

Zur Detektion der im SDS-PAGE aufgetrennten Proteine mittels Western Blot wurden diese auf eine PVDF-Membran transferiert. Dazu wurde zunächst ein Stück einer PVDF-Membran in der Größe des Gels kurz in Methanol zur Aktivierung geschwenkt, anschließend 2 min in Wasser und für weitere 2 min in 1× Blockpuffer inkubiert. Vier Whatman-Papierstücke wurden ebenfalls mit 1× Blockpuffer getränkt. Für den Aufbau des Blots wurden zunächst zwei vorbereitete Stücke Whatmanpapier luftblasenfrei auf die Anodenplatte der Blotapparatur gelegt. Anschließend wurde darauf die vorbehandelte PVDF-Membran, dann das SDS-Gel und als Abschluss die restlichen zwei Stücke Whatmanpapier luftblasenfrei gegeben. Die Apparatur wurde mit der Kathodenplatte geschlossen. Der Proteintransfer erfolgte im Transferpuffer durch Anlegen einer elektrischen Spannung für 1 h bei 200mA.

3.1.9.5 Detektion und Visualisierung der Proteine

Nach dem Transfer wurde die Membran für 1 h bei RT im Blockpuffer inkubiert, um unspezifische Bindungen der Antikörper an die Membran zu verringern. Die PVDF-Membran wurde mit den vorverdünnten 10 ml Primärantikörperlösungen inkubiert. Die Inkubation des Primärantikörpers erfolgte in allen Fällen bei 4 °C über Nacht. Nachfolgend wurde die Membran 3 Mal für 10 min bei RT in Waschpuffer gewaschen und anschließend mit dem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper für 1-2 h bei RT inkubiert. Um nicht gebundenen Sekundärantikörper zu entfernen, wurde die PVDF-Membran erneut 3 Mal für 10 min bei RT in Waschpuffer gewaschen. Zur Detektion des gebundenen Sekundärantikörpers folgte eine Inkubation mit Hilfe des Western Blot Detektion Kits (ImmunoCruzTM Western Blotting Luminol Reagent). Dabei wurden die Lösungen im Verhältnis 1:1 vermischt und auf die Membran gegeben. Wenn das Signal schwach war, wurde die PVDF-Membran mit dem SuperSignal[®] West Femto Maximum Sensitivity Substrate behandelt. Die dadurch hervorgerufene Chemilumineszenz-Reaktion wurde durch das Gerät (MicroChem 2) detektiert und mittels des Programms GelCapture analysiert.

3.1.10 ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

Die differenzierten T-Zellsubtypen produzieren verschiedene Zytokine und exprimieren Oberflächenmarker, welche der Differenzierungsphase entsprechen. Um die Zytokinproduktion der differenzierten T-Zellen zu quantifizieren, wurde die ELISA-Methode verwendet.

Bei einem ELISA handelt sich um eine Immundetektionsmethode, die auf einer spezifischen Antigen-Antikörper- und Enzym-Reaktion basiert. Die in diesem Experiment verwendeten ELISAs waren „Sandwich“-Methoden, wobei das Antigen in der Probe an die in der Platte beschichteten Erstantikörper bindet und in der zweiten Phase von dem biotinylierten Zweitantikörper erkannt wird. Im nächsten Schritt verwendet man Streptavidin (um das Signal zu verstärken), welches an Biotin bindet und seinerseits mit einem Enzym gekoppelt ist. Zur Detektion der Menge an gebundenem Antigen wird schließlich ein geeignetes chromogenes Substrat des Enzyms verwendet, dessen Umsatz photometrisch vermessen wird.

Die 96 Wellplatten wurden mit den entsprechenden „Capture“-Erstantikörpern (50 µl/Well) beschichtet und über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer gelagert, wobei die Antikörper in unterschiedlichen Beschichtungs-Puffern und verschiedenen Konzentrationen verdünnt wurden. In der unteren Tabelle sind die Beschichtungs-Puffer und die Verdünnungsfaktoren der Antikörper für die gemessenen Zytokine dargestellt.

Gemessenes Zytokin	Beschichtungs-Puffer	Konzentration oder Verdünnungsfaktor des Capture-Antikörpers	Konzentration oder Verdünnungsfaktor des Detektions-Antikörpers
IL-4	Coating Puffer	0,5 µg/ml	50 ng/ml
IL-5	Coating Puffer	0,5 µg/ml	50 ng/ml
IL-9	Coating Puffer	1:1.000	1:1.000
IL-13	PBS-Puffer	4,0 µg/ml	200 ng/ml
IL-17	PBS-Puffer	2,0 µg/ml	400 ng/ml
IL-17F	Im Kit vorhanden	1:250	1:250
IL-21	Im Kit vorhanden	1:250	1:250

Am Folgetag wurden die Platten 2-mal mit 250 µl/Well Waschpuffer gewaschen. Um unspezifische Bindungen der Proteine zu verhindern, wurden danach in jedes Well 200 µl Blockpuffer pipettiert und die Platten wurden bei Raumtemperatur 1 h inkubiert. Nun wurden die Platten erneut 2-mal mit 250 µl/Well Waschpuffer gewaschen. Zwischenzeitlich wurden die Proben und Kontroll-Standardwerte mit rekombinanten Zytokinen mit dem Blockpuffer in einer Zweierverdünnungsreihe verdünnt. Alle Proben wurden in einer Doppelbestimmung in 50 µl pipettiert. Nach dem Auftragen der Proben wurden die Platten über Nacht bei 4 °C in der feuchten Kammer inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Platten 4-mal mit 250 µl/Well Waschpuffer gewaschen, um alle ungebundenen Bestandteile komplett zu eliminieren. Danach wurden die Detektionsantikörper, wie in der oberen Tabelle aufgeführt, in Block-Puffer verdünnt und pipettiert. Die Leerkontrollen wurden dabei mit 100 µl Blockpuffer aufgefüllt, während in alle anderen Wells 100 µl verdünnte Detektionsantikörper zugegeben wurden. Nach Inkubation für 45 min bei Raumtemperatur wurden die Platten 6-mal mit 250 µl/Well Waschpuffer gewaschen. Danach wurde die im Block-Puffer (1:10.000) verdünnte Streptavidin-Alkalische Phosphatase - Konjugationslösung vorbereitet und nach dem Abtropfen der Platten in 100 µl in alle Wells pipettiert, außer den Leerkontrollen, welche anstatt Streptavidin- Konjugationslösung Block-Puffer erhielten. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei Raumtemperatur wurden die Platten 8-mal mit 250 µl/Well Waschpuffer gewaschen, um ungebundenes Streptavidin zu entfernen.

Jetzt wurden in jedes Well 100 µl 1mg/ml Phosphatase Substrat (p-Nitrophenyl Phosphate) zugegeben, welches in 1 M Diethanolamine-Puffer gelöst worden war. Danach wurden die Platten sofort im Dunkeln bei Raumtemperatur über 1 h inkubiert. Der Farbumschlag nach gelb konnte mittels Mikropplatten Lesegerät (Fluostar Omega) bei einer Wellenlänge von 405 nm/490 nm gemessen werden. Die Analyse der Messwerte und Quantifizierung erfolgte durch das Programm MARS Data Analysis.

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer

Nach der Gewinnung von Lymphozyten aus sekundärem Lymphgewebe und der Aufreinigung der CD4⁺Th Zellen (s.u.), sowie nach dem Ernten der HEK-Zellen, wurde die Anzahl der lebendigen Zellen jeweils mittels Neubauer-Zählkammer berechnet. 10µl Zellsuspension wurden mit Trypanblau-Lösung verdünnt (je nach Dichte der Zellsuspension variierte die Menge Trypanblau zwischen 200 und 500µl) und auf die Kammer geladen. Die Zellzahl in den 4 großen Quadranten wurde unter dem Lichtmikroskop (der Vergrößerungsfaktor liegt bei 100) bestimmt, wobei lebendige Zellen rund und transparent aussahen, da sie die Trypanblau Farbe nicht aufnahmen. Die Gesamtzellzahl der Zellsuspension wird durch die folgende Formel berechnet:

$$\text{Gesamtzellzahl} = \text{Zellzahl}_{\text{gq}} / 4 \times \text{Vf}_{\text{TB}} \times \text{V}_{\text{sus}} \times 10,000$$

Zellzahl_{gq} : Zellzahl von 4 großen Quadranten

Vf_{TB} : Verdünnungsfaktor in der Trypanblau Lösung

V_{sus} : Volumen der Zellsuspension

10,000 : Kammerfaktor

3.2.2 Generierung von Virenüberständen mittels HEK (*human embryonic kidney*)-Zellen

Bei der HEK-Zelllinie handelt es sich um eine Zelllinie, die zur effektiven Generierung von ecotropischen retroviralen Partikeln verwendet wird. Durch Zugabe der retroviralen

Verpackungsplasmide pEco und pCGP zusammen mit den *gfp*-gekoppelten *irf4*-Mutantenvektoren erfolgt die Generierung der benötigten Retroviren für die nachfolgende Transduktion in T-Zellen.

3.2.2.1 Kultivierung und Umsetzen der HEK-Zellen

Die HEK-Zellen wurden in 6-Well Kulturplatten mit 5ml DMEM Medium bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert und alle 3-4 Tage (sobald der Boden des Wells mit Zellen bedeckt war) in ein neues Well umgesetzt. Hierbei wurde zuerst der Überstand des alten Mediums komplett abgezogen, um tote Zellen zu eliminieren. Bodengebundene Zellen wurden mit 1ml frischem Medium geerntet und in das neue Well überführt.

3.2.2.2 Transfektion von HEK-Zellen mit der Kalziumphosphat-Methode

Hierfür wurden 2×10^6 HEK-Zellen in Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 10 cm mit 10 ml DMEM Medium bei 37°C und 5% CO₂ einen Tag inkubiert. Die Reagenzien (CaCl₂ und HBS Puffer) wurden am Vortag auf Raumtemperatur gebracht. Mit der folgenden Tabelle wurden die Transfektionsansätze angesetzt und durch Blubbern gründlich gemischt, wobei HBS Puffer zum Schluss in die Lösung getropft wurde. Nach Wegnahme des Mediums und Zusatz von 8.5ml frischem Medium wurden von dem Ansatz auf jede Schale 1,7ml getropft.

Reagenzien	Menge
Plasmid	14ng
pECO	3ng
pCGP	3ng
2M CaCl ₂	106,3 µl
dsH ₂ O	bis 850µl
2×HBS Puffer	850µl

Nach 8-stündiger Transfektion bei 37°C und 5% CO₂ wurde das alte Medium abpipettiert und die Platte wurde mit 5ml BSS Puffer 2 Mal gewaschen zur Eliminierung des im Transfektionsansatz enthaltenen Ca²⁺. Es folgte die Auffüllung der Platte mit 5ml RPMI Medium. Nach 24stündiger Bebrütung im CO₂-Inkubator wurde der virenhaltige Überstand entnommen und die Platte mit 5ml neuem RPMI Medium aufgefüllt. Mit der gleichen Methode wurde auch nach 48 Stunden der Virenüberstand entnommen. Um die toten Zellreste zu eliminieren, wurden die entnommenen

Überstände (24- und 48-stündiger) bei 4000 rpm für 10 min zentrifugiert und der Überstand gemischt und in neue Zentrifugenröhrchen überführt. Die dadurch erhaltenen Virenüberstände wurden in 2ml Eppi-Zentrifugenröhrchen aliquotiert (je 1,7ml) und im -80°C Gefrierschrank gelagert. Die Transfektionseffizienz von HEK-Zellen wurde anhand der GFP - Expression mittels Durchflusszytometrie (s.u.) im FITC-Kanal gemessen.

3.2.3 Aufreinigung von CD4⁺/CD8⁺T-Zellen

Die Lymphozyten aus den sekundären Lymphorganen, also Lymphknoten und Milz, bestehen aus verschiedenen Zellpopulationen, die sich durch verschiedene CD-Marker voneinander unterscheiden. Um die Wirkung der IRF4-Mutanten auf die Differenzierung von Th/Tc-Zellen zu untersuchen, wurden CD4⁺Th-/CD8⁺Tc-Zellen aufgereinigt. Dafür wurden die anderen Populationen, also alle CD4⁻-(für CD4⁺Th-Zellaufreinigung) und CD8⁻-(für CD8⁺Tc-Zellaufreinigung) Zellen, mithilfe entsprechender Antikörpern markiert, über einen Zwischenschritt (s.u.) an biotinylierte Beads gebunden und im Magnetfeld eliminiert (negative Selektion). Die Reinheit der CD4⁺Th-/CD8⁺Tc-Zellen wurde anschließend mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Sämtliche Lymphknoten und die Milz wurden hierzu zunächst den Mäusen entnommen und in einem BSS-Puffer enthaltenden 15ml Falkonröhrchen getrennt gesammelt. Diese Gewebe wurden dann zerrieben und durch einen Filter mit Porendurchmesser 30µm filtriert, die Erythrozyten aus der Milzprobe wurden durch die Behandlung mit 3ml NH₄Cl Lösung für 4 min komplett lysiert. Die Milz- und Lymphknoten- Proben wurden in einem Falkonröhrchen gepoolt und die Gesamtzellzahl durch die oben genannte Methode bestimmt. Nach 5minütiger Zentrifugation in PBS/FCS Puffer bei 1500rpm und 4°C wurden die Zellen in MACS Puffer (250µl/10⁸ Zellen) aufgenommen und suspendiert. Danach wurde die Zellsuspension für 10 min bei 4°C mit einem Gemisch aus Antikörpern inkubiert (jeweils 2,5µl/10⁸ Zellen), die sich gegen die Oberflächen-Marker von unterschiedlichen Zellpopulationen in sekundärem Lymphgewebe richten. Für die CD4⁺Th-Zellaufreinigung waren dies anti-Maus CD8a-FITC, anti-Maus CD11b-FITC, anti-Maus CD11c-FITC, anti-Human/Maus CD45R (B220) -FITC, anti-Maus Ter-119-FITC und anti-Maus CD49b-FITC, für die CD8⁺Tc-Zellaufreinigung wurde anti-Maus CD8a-FITC durch anti-Maus CD4-FITC ersetzt. Dabei binden die

Antikörper an das Antigen und die Zellen werden mit Antikörper-gekoppeltem FITC markiert.

Nach dem Waschen mit MACS Puffer wurde das Zellpellet mit MACS Puffer (100µl/10⁸Zellen) suspendiert und anschließend mit dem Kombi-Anti-FITC-Biotin/Streptavidin Reagenz (1µl/10⁸ Zellen) behandelt, um die Zellen im weiteren Verlauf an die biotinylierten Beads zu binden. Nach 15minütiger Lagerung der Zellen im 4°C Kühlraum wurden die Zellen zweimal mit MACS Puffer gewaschen und die Beads (1,5ml/10⁸ Zellen) wurden hinzugefügt. Diese Suspension wurde pro 1,5ml auf 2ml Eppis verteilt und dann 15 min lang auf dem Rotator langsam gemischt (Drehzahl: 7-8/Minute). Danach wurde die Probe für weitere 15 min auf den Magnetständer gestellt, wobei die Beads-gebundenen Zellen sich zum Magnet hin orientieren und die nicht markierten Zielzellen in der Lösung bleiben. Durch das Abnehmen der Lösung wurden so die Zielzellen isoliert und ihre Anzahl und Reinheit für das weitere Experiment mittels Neubauzählkammer und FACS-Analyse (Färbung siehe 3.2.7) gemessen.

3.2.4 Aufreinigung von naiven Th-/Tc-Zellen

3.2.4.1 Aufreinigung von naiven Th-Zellen

Naive T-Lymphozyten tragen auf ihrer Oberfläche neben dem CD4-Marker einen dem Reifungsstadium entsprechenden Marker (CD62L) und unterscheiden sich dadurch von anderen T-Zellsubpopulationen. Die durch die oben genannte Methode aufgereinigten CD4⁺Th-Lymphozyten wurden mit dem Kit (CD4⁺CD62L⁺ T Cell Isolation Kit mouse) behandelt, um naive T-Zellen positiv zu selektieren. Hierbei wurden CD4⁺CD62L⁺T Zellen mit Beads-gekoppelten anti-CD62L Antikörpern markiert. Beim Durchlauf durch die Säule im Magnetstand blieben dieses Mal die Zielzellen in der Säule, während die nicht markierten Zellen durchgelaufen waren. Die behaltenen Zellen wurden nach der Wegnahme der Säule von dem Magnetstand eluiert. Alle Reagenzien wurden nach Angabe des Herstellers pipettiert.

Nach der Sortierung wurden 10µL der Probe zur Bestimmung der Reinheit der naiven CD4⁺CD62L⁺Zellen abgenommen, gefärbt (siehe 3.2.7) und im FACS gemessen.

3.2.4.2 Aufreinigung von naiven Tc-Zellen

Die durch die negative Selektion aufgereinigten CD8⁺Tc-Zellen (siehe 3.2.3) wurden mittels FACS ARIA III nach den naiven CD8⁺-Markern sortiert (siehe auch 3.2.8). Hierfür wurden die CD8⁺Tc-Zellen (ca. 20×10^6 /ml) in PBS/FCS Puffer aufgenommen und mit 4 µg/ml anti- CD8a-V500, 4 µg/ml anti-CD62L-AlexaFluor und 2 µg/ml anti-CD44-APC-Cy7 Antikörpern gleichzeitig gefärbt. Nach einer 10 min. Inkubation bei 4°C wurden die Zellen einmal mit PBS/FCS Puffer gewaschen und ins FACS ARIA III gebracht. Die Sortierung der CD8⁺/CD44⁻/CD62L⁺ Zellen folgte der Methode nach 3.2.8.

3.2.5 Differenzierung und retrovirale Transduktion von Th/Tc-Zellen

Unter optimalen Bedingungen differenzieren Th/Tc-Lymphozyten zu unterschiedlichen Th/Tc-Subpopulationen weiter. Dazu sind 3 Signale nötig: Das erste Signal entspricht dem Antigenkontakt, das zweite wird durch costimulatorische Moleküle vermittelt und Zytokine gelten als das dritte Signal. Durch die Zugabe verschiedener Antikörper und Zytokine erfolgte die Differenzierung der Th/Tc-Lymphozyten *ex vivo*.

Hierfür wurde eine 48 Wellplatte am Tag vorher mit 250 µl anti-CD3 Antikörper mit einer Konzentration von 5 µg/ml (v/v) in Coating-Puffer beschichtet und im 4°C Raum gelagert. Der gegen den CD3 Komplex des T Zellrezeptors gerichtete Antikörper fungiert als Antigenersatz, da er ein dem echten Antigen vergleichbares Signal auslöst. Nach dreimaligem Waschen der Platte mit BSS-Puffer wurden die aufgereinigten Th/Tc-Lymphozyten (pro Well $0,5 \times 10^6$ Zellen/1ml Th/Tc0-Medium, s.u.) verteilt. Unter Th/Tc0-Bedingung wurden die Zellen 2 Tage lang bebrütet, während dessen die Virentransduktion durchgeführt wurde (24 Std nach der Zellverteilung). Mittels viraler Transduktion wurden die verschiedenen IRF4-Mutanten in die Th/Tc-Lymphozyten eingebracht, um ihre Wirkung auf die Zelldifferenzierung weiter in Zellkultur zu untersuchen.

Hierfür wurden die bei -80°C gelagerten Virenüberstände bei Raumtemperatur aufgetaut und dazu 7 µg/ml Polybrene und 50 IU/ml hr (human recombinant) IL-2 hinzugefügt. Reines RPMI Medium mit einer vergleichbaren Konzentration an Polybrene und hrIL-2 wurde als Negativkontrolle der Transduktion verwendet. Das

vorhandene Th0-Medium wurde komplett abgenommen und gegen die Virenüberstände ausgetauscht. In jedes Well wurden mit 400 µl Polybrene und hrIL-2 gemischte Virenüberstände gebracht und die virale Transduktion erfolgte durch Zentrifugation mit 2700 rpm bei 37°C für 90 min. Nach der Transduktion wurden die Zellen wieder dem zuvor abgenommenen Medium ausgesetzt.

24 Std nach der letzten Transduktion wurde das Th/Tc0-Medium gegen die frisch angesetzten Differenzierungsmedien ausgetauscht (siehe Tabelle). Die Th9/Tc9-Differenzierung erfolgte in 48 Std, die Th2/Tc2- und Th17/Tc17- Differenzierung benötigte dagegen 72 Std. Inzwischen wurden die Zellen bei 5% CO₂ und 37°C bebrütet. In den folgenden Tabellen sind die Berechnungen der Reagenzien und die Bedingungen für die jeweilige Differenzierung zu finden.

Reagenzien und ihre Konzentrationen für die Differenzierung der Th/Tc-Subpopulationen

	Th0/Tc0	Th2/Tc2	Th9/Tc9	Th17/Tc17
anti-CD28	-	3 µg/ml	3 µg/ml	3 µg/ml
anti-IFN γ	2,5µg/ml	2,5µg/ml	2,5µg/ml	2,5µg/ml
anti-IL-4	5%	-	-	5%
rm IL-4	-	10ng/ml	20ng/ml	-
rm IL-6	-	-	-	10ng/ml
rh TGF-β-1	-	-	1ng/ml	1ng/ml

Differenzierungsbedingungen der jeweiligen Th-Subpopulationen

Kulturtag	Durchführung
1	CD4 ⁺ /CD8 ⁺ -Zellaufreinigung, Inkubation bei Th0/Tc0-Bedingungen
2	Virale Transduktion
3	Medium wird durch frisches Differenzierungsmedium ersetzt
4	-
5	Messung der Th9/Tc9-Differenzierung
6	Messung der Th2/Tc2- & Th17/Tc17-Differenzierung

3.2.6 Unspezifische Stimulation von Th/Tc-Zellen

Durch Zugabe von PMA und Ionomycin können T-Lymphozyten Antigen-unabhängig aktiviert werden. Dabei aktivieren PMA und Ionomycin die intrazelluläre Signalkaskade und beeinflussen die Proteinkinase C-Aktivität und den Ca²⁺-Einstrom. Zusätzlich zugesetztes Brefeldin A inhibiert den Golgi-Apparat und verhindert damit die

Zytokinsekretion, dementsprechend bleiben die Zytokine in der Zelle und sind dort durch Färbung nachweisbar.

Hierfür wurden PMA (50ng/ml), Ionomycin (750ng/ml) und Brefeldin A (5µg/ml) jeweils in RPMI Medium vorbereitet und nach Waschen in PBS/FCS wurden die Zellen damit 4 Std im Brutschrank (5% CO₂, 37°C) stimuliert. Anschließend wurden die Zellen nach zweimaligem Waschen (mit PBS/FCS) für die FACS-Analyse gefärbt.

3.2.7 Oberflächenfärbung und intrazelluläre Färbung

Immunzellen, und dazu gehören auch T-Lymphozyten, besitzen die Eigenschaft, je nach Differenzierungsstadium unterschiedliche Marker auf ihrer Oberfläche zu tragen. Außerdem verfügen CD4⁺/CD8⁺-T-Lymphozyten in den unterschiedlichen Differenzierungsphasen über die Fähigkeit, Zytokine zu produzieren. Anhand dieser Merkmale lassen sich Zellpopulationen voneinander unterscheiden und die Bestimmung des Differenzierungsstadiums von T-Lymphozyten beruht auf diesen Merkmalen. Die Oberflächenmarker (CD Marker) sind durch Oberflächenfärbung detektierbar, die Zytokinproduktion dagegen kann nur durch intrazelluläre Färbung gemessen werden.

Um die Reinheit der CD4⁺/CD8⁺ oder CD4⁺CD62L⁺ Zellen in einer Zellsuspension zu bestimmen, wurde die Oberflächenfärbung durchgeführt. Dafür wurden die Zellen nach dem Waschen mit PBS/FCS mit der jeweiligen Antikörperlösung (1:500 in PBS/FCS) für 20 min bei 4°C inkubiert. Nach dem nochmaligen Waschen mit PBS/FCS-Puffer wurde die FACS-Messung durchgeführt.

Der Anteil der differenzierten Th/Tc-Lymphozyten ist durch die intrazelluläre Färbung von Interleukinen darzustellen. Hierfür wurden die T-Lymphozyten nach dem zweimaligen PBS Waschschrift mit 2%-iger Formaldehydlösung für 20 min in Dunkelheit fixiert. Danach wurden die fixierten Zellen mit PBS/FCS- und Saponin-Puffer jeweils einmal gewaschen. Als Th-Zelldifferenzierungsmarker wurde die intrazelluläre Expression von IL-4, IL-9, IL-13 und IL-17A gemessen. Als Isotypkontrollen wurden Ratte IgG1 kappa und Ratte IgG2a kappa Antikörper verwendet. Jeder Antikörper wurde vor der Färbung 1:500 mit Saponin-Puffer vorverdünnt. Die Färbung erfolgte für 20 min bei 4°C. Anschließend wurden die Proben je einmal mit Saponin- und PBS/FCS-Puffer gewaschen und die FACS-Messung durchgeführt.

3.2.8 Durchflusszytometrische Analyse und Zellsortierung

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie und der Zell-Sortierung (FACS = *fluorescence activated cell sorting*) ist es möglich, Zellen unterschiedlicher Größe und Granularität auf Einzelzelebene zu untersuchen. Die weitere Markierung der Zellen mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern ermöglicht eine detaillierte Analyse verschiedener von den Zellen exprimierter Moleküle und die Aufreinigung interessierender Zell-Subpopulationen.

Grundlage einer FACS-Analyse ist eine (gefärbte) Suspension von Einzelzellen, die einzeln einen fokussierten Laserstrahl passieren. Bei der Messung werden die Zellen durch eine Kapillare gesaugt und gelangen einzeln in die Durchflusszelle, in der sie durch Laserlicht angeregt werden. Detektiert wird zum einen die Lichtstreuung, zum anderen das emittierte Fluoreszenzlicht der Antikörper-gekoppelten Fluorophore.

Die Zellen streuen einen Teil des Lichts, welches mittels Detektoren (Photomultiplier) nachgewiesen wird. Die Menge des gestreuten Lichts korreliert mit der Größe der Zelle und mit ihrer Komplexität. Das Vorwärtsstreulicht (FSC = Forward Scatter) ist ein Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel und hängt vom Volumen der Zelle ab. Das Seitwärtsstreulicht (SSC = Sideward Scatter) ist ein Maß für die Brechung des Lichts im rechten Winkel, die von der Granularität der Zelle, der Größe und Struktur ihres Zellkerns und der Menge der Vesikel in einer Zelle beeinflusst wird. Mit diesen beiden Parametern lassen sich zum Beispiel die Zellen des Blutes bereits ungefärbt recht gut unterscheiden (Abb. 4).

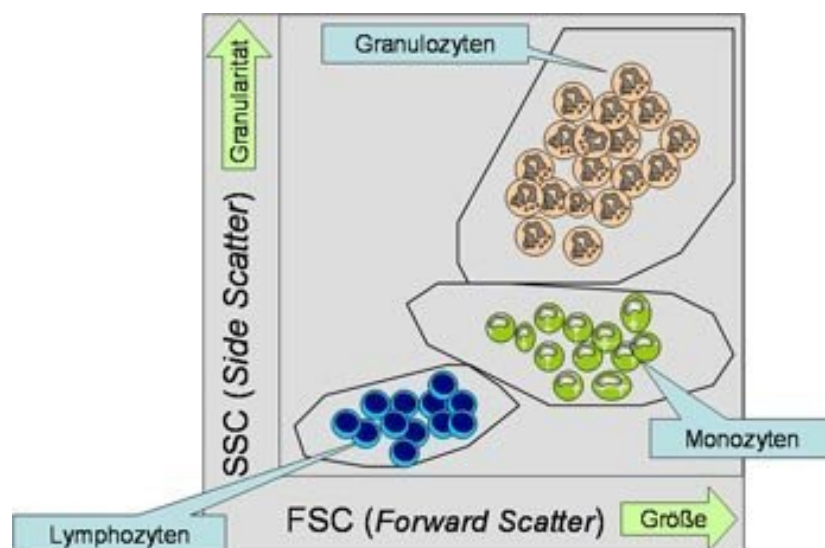


Abbildung 4. Charakterisierung von ungefärbten Zellen anhand der Lichtstreuung, dargestellt im sog. Dot Plot. Die Zellen werden nach ihrem Vorwärtsstreulicht und Seitwärtsstreulicht im Diagramm dargestellt. Die blaue Ansammlung entspricht den Lymphozyten (klein, kaum Granula), die grüne den Monozyten (groß, kaum Granula) und die braune den Granulozyten (groß, viel Granula).

Gleichzeitig mit dem gestreuten Licht kann man im Durchflusszytometer Fluoreszenzfarben messen. Dafür verwendet man Antikörper, die mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind. Die Antikörper sind meist gegen bestimmte Proteine (z.B. CD-Marker) gerichtet. Durch Einsatz von verschiedenfarbigen Lasern und vor allem Filtern kann die Anzahl der einsetzbaren Farbstoffe pro Messung und damit die Informationsdichte erhöht werden. Es ist möglich, in einer Messung verschiedene Marker zu detektieren, sofern sich die Wellenlängen des emittierten Fluoreszenzlichts der eingesetzten Fluorophore unterscheiden (Mehrfachfärbungen, Abb. 5).

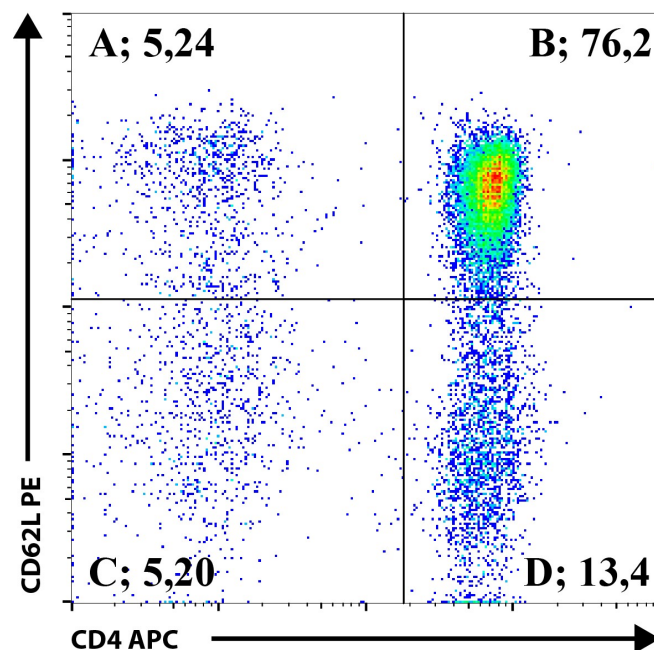


Abbildung 5. Schematische Darstellung eines Dot Plots für CD4- und CD62L-Färbungen.

Nach der Aufreinigung von naiven T-Zellen wurden diese Zellen mit α -CD4- (konjugiert mit dem Farbstoff APC) und α -CD62L- (konjugiert mit PE) Antikörpern gefärbt und per FACS analysiert. Naive T-Zellen ($CD4^+CD62L^+$) positionieren sich in der oberen rechten Region (B), einzelpositive Zellen ($CD4^+CD62L^-$ und $CD4^-CD62L^+$) befinden sich unten rechts (D) und oben links (A) und die untere linke Region (C) beinhaltet doppelnegative Zellen ($CD4^-CD62L^-$). Die Zahlen geben die relativen Häufigkeiten (%) an.

Je nach Zellzahl wurden die mit den jeweiligen Antikörpern gefärbten Zellen in 200 µl-300 µl PBS/FCS aufgenommen und am FACS-Calibur analysiert (Abb. 6). Um die lebendigen Zellen auszuwählen, wird dabei zunächst ein sog. Gate (eine definierte Region) auf die entsprechenden Parameter gesetzt (FSC- versus SSC- Bild). Anschließend wird die Grenze zwischen einer negativ und einer positiv gefärbten Population festgelegt, wobei man sich an einer ungefärbten Negativ-kontrolle orientiert. Werden zwei verschiedene Parameter während einer Messung erfasst, bedient sich meist man einer zweidimensionalen Darstellung, um so die Korrelationsverteilung der Parameter zu zeigen. Diese korrelierten Zweiparameterdarstellungen werden in der Regel als "Punktdarstellungen" ("Dot Plots") abgebildet. Auf diese Weise lassen sich Subpopulationen charakterisieren und identifizieren (Abb. 6).

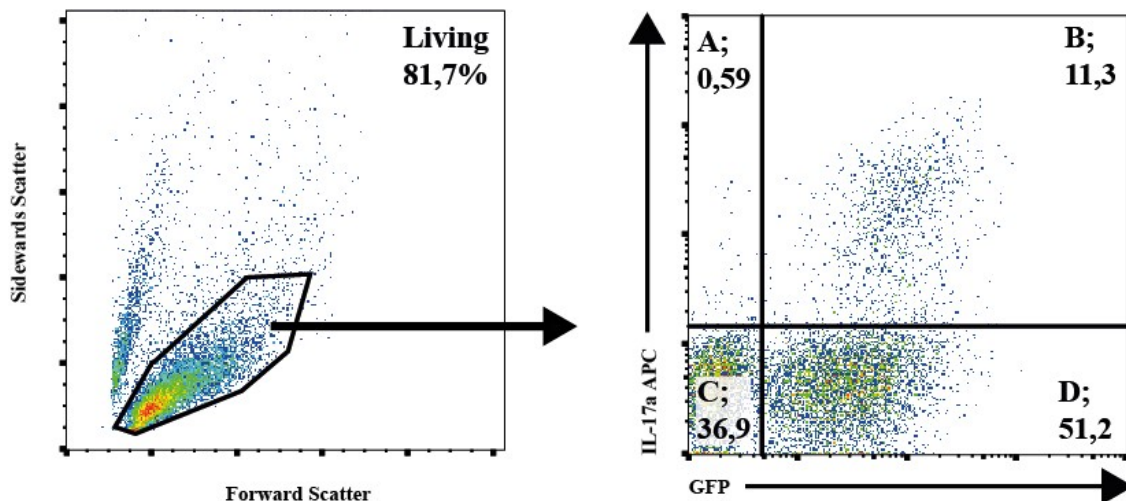


Abbildung 6. Strategie der FACS-Analyse von Th17- Zellen in IRF4- (oder Mutanten) transduzierten Zellen. Region R1 im Streulicht Dot-Plot links definiert die lebendigen T-Zellen. Nur diese Zellen („Gate“) werden im Fluoreszenz-Dot-Plot rechts (GFP-Farbe = x-Achse) und IL-17aAPC-Färbung (y-Achse) analysiert. Die Region unten links (C) entspricht den GFP⁻/IL-17a⁻ Zellen, oben links (A) den GFP⁻/IL-17a⁺ Zellen, unten rechts (D) den GFP⁺/IL-17a⁻ Zellen und oben rechts (B) den GFP⁺/IL-17a⁺ Zellen. Die Zahlen entsprechen der relativen Häufigkeit (%).

Die Zellsortierung interessierender Subpopulationen erfolgte am FACS Aria III. Hierfür wurden ca. 20×10^6 Zellen/ml in PBS/FCS aufgenommen. Die Zellen wurden in ein mit 100% FCS vorinkubiertes (2-3 h, bei 37 °C; zur Vermeidung unspezifischer Zelladhärenz) 1,5 ml oder 15 ml Reaktionsgefäß sortiert. Anschließend erfolgte eine

Reinheitmessung der Zellen. Sortierte Zellen, die zum Zelltransfer in Mäuse dienten, wurden zweimal mit PBS gewaschen (2000 rpm, 5 min), um das FCS entfernen. Die Daten wurden mit Hilfe der *FlowJo* Software ausgewertet.

3.3 Statistische Analyse

Alle Daten in dieser Arbeit wurden mittels des ungepaarten Student's T-test analysiert.

4 Ergebnisse

4.1 Generierung von IRF4-Mutanten und deren Überexpression mit Hilfe von Retroviren

Um die Funktion einer Domäne oder bestimmten Aminosäure innerhalb von IRF4 in ihrer Wirkung zu belegen, wurde diese durch Mutagenese deletiert, bzw. ausgetauscht.

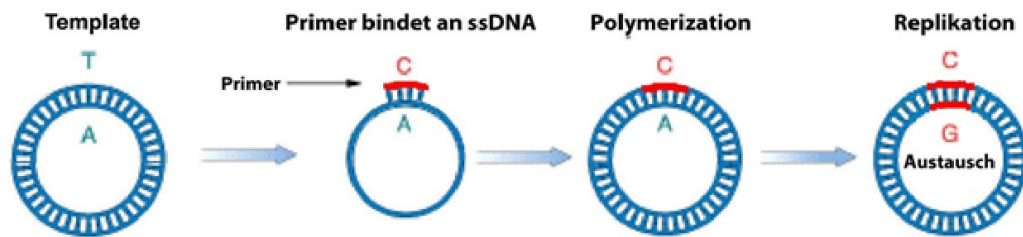
4.1.1 Primerdesign und Generierung der IRF4-Mutanten

Die bei der Mutagenese zugrunde liegende Methode war die herkömmliche PCR, welche durch die Bindung des Primers an die Zielsequenz und die anschließende Polymerase Reaktion erfolgte. Für die Mutagenese wurden die Primer so aufgebaut, dass bei der Kettenreaktion die Mutationsstellen entweder deletiert oder ein Austausch von einer oder mehreren Aminosäuren durchgeführt wurde.

Bei der Deletionsmutagenese wurden die Primer so erstellt, dass die vordere und die hintere Hälfte der Sequenz komplementär zu der des Plasmids waren, aber sich auf dem Plasmid dazwischen die zu deletierende Region befand. Die Nukleinsäuren, welche nicht mehr im PCR-Produkt vorhanden sein sollten, wurden daher durch die Primerbindung während der PCR nicht mit polymerisiert und somit deletiert (siehe Abb. 7). Zur Generierung der Austauschmutanten wurden mehrere der im Plasmid vorhandenen Nukleotide beim Aufbau der Primer gezielt durch die mutierten Nukleotide ersetzt, während die restliche Primersequenz unverändert zu der von IRF4 war. Der synthetische Primer konnte nun an die zuvor durch Denaturierung einzelsträngig gemachte Zielsequenz hybridisiert werden, wobei die eine oder die wenigen Positionen, die verändert werden sollten, ungepaart blieben. Ausgehend von den Primern konnte danach mit der DNA-Polymerase und einem Gemisch der 4 dNTPs ein DNA-Doppelstrang synthetisiert werden, der die gewünschten Mutationen einschloss. Mit dem kommerziellen Mutagenese Kit (Quickchange®II Site Directed Mutagenesis Kit, Agilent Technologies) konnte ich bis zu 1260bp deletieren oder bis zu 6bp austauschen.

Side-directed mutagenesis

(a) Austausch der Basenpaare



(b) Deletion

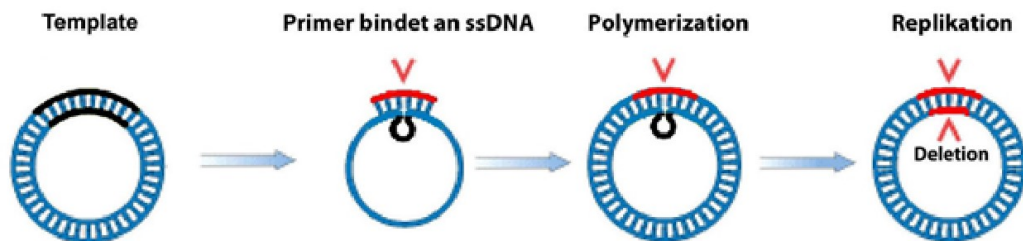


Abbildung 7. Die Prinzipien der Mutagenese.

(a): Bei der Generierung der Austauschmutanten bindet der Primer an die Mutationsstellen, wobei die auszutauschende Nukleinbase (z.B. Adenin) der ssDNA durch die andere Nukleinbase (z.B. Cytosin) im Primer ersetzt wird. Durch die danach folgende PCR-Reaktion, die ja immer nur den mutierten Primer verwendet, wird daraufhin nur die geänderte DNA-Sequenz vervielfältigt. (b): Bei der Deletion bildet sich ein Loop und die zu deletierende Stelle wird von der PCR-Reaktion ausgeschlossen. Das ursprüngliche DNA Template wird zum Schluss durch das Enzym *DpnI* abgebaut, welches die methylierten Nukleinbasen spezifisch verdaut, die bei der neu synthetisierten DNA nicht vorhanden sind.

In Abb. 8 und 9 sind beispielhaft die Sequenzen erfolgreich erstellter Mutanten dargestellt, in Abb. 8 bei Deletion, in Abb. 9 bei Aminosäure-Austausch. In Tabelle 2.1 ist eine Übersicht sämtlicher in dieser Arbeit generierter Mutanten erstellt. Die Korrektheit wurde jeweils durch Sequenzierung überprüft.

```

      *      *      *      *      *      *      *      *      *
1000 atctactgggatgggcccctggcactgtgcagcgatcgccccaacaagctagaaagagaccagacttgcaagctctttgacacacagcagtttctatcag 1099
      |
264 ATCTACTGGGATGGGCCCCTGGCACTGTGCAGCGATCGGCCCAACAAGCTAGAAAGAGACCAGACTTGCAAGCTCTTTGACACACAGCAGTTTCTATCAG 165
      *      *      *      *      *      *      *      *      *

      *      *      *      *      *      *      *      *      *
1100 agctgcaagtgtttgctcaccatggccggccagcaccgagattccaggtgactctgtgcttttggtgaggagtttccagaccctcagagacagaggaagct 1199
      |
164 AGCTGCAAGTGTTTGTCTACCATGGCCGGCCAGCACCGAGATTCCAGGIGACTCTGTGCTTTTGGTGAGGAGTTTCCAGACCTCAGAGACAGAGGAAGCT 65
      *      *      *      *      *      *      *      *      *

      *      *      *      *      *      *      *      *      *
1200 catcacagctcatgtggaacctctgctagccagacaactgtattactttgctcaaaaaaacactggacatttctgagggggtacagagttacctgaacac 1299
      |
64 CATCACAGCTCATGTGGAACCTCTGCTAGCCAGACAACCTGTATTACTTTGCTCAACAAAAC----- 4
      *      *      *      *      *      *      *      *      *

      *      *      *      *      *      *      *
1300 gttaccactccagattaccacgctccctccgtcattcttccatccaagagtga 1353
      |
3 -----TGA 1

```

Abbildung 8. Das Sequenzierungsergebnis der Mutante d421-450

Die rot markierten Nukleinsäuren wurden deletiert. Bei dem dargestellten Alignment stellt die obere Sequenz die ursprüngliche IRF4-Sequenz dar und die untere die der Mutante d421-450.

```

      *      *      *      *      *      *      *      *      *
1001 tctactgggatgggcccctggcactgtgcagcgatcgccccaacaagctagaaagagaccagacttgcaagctctttgacacacagcagtttctatcaga 1100
      |
353 TCTACTGGGATGGGCCCCTGGCACTGTGCAGCGATCGGCCCAACAAGCTAGAAAGAGACCAGACTTGCAAGCTCTTTGACACACAGCAGTTTCTATCAGA 254
      *      *      *      *      *      *      *      *      *

      *      *      *      *      *      *      *      *      *
1101 gctgcaagtgtttgctcaccatggccggccagcaccgagattccaggtgactctgtgcttttggtgaggagtttccagaccctcagagacagaggaagctc 1200
      |
253 GCTGCAAGTGTTTGTCTACCATGGCCGGCCAGCACCGAGATTCCAGGIGACTCTGTGCTTTTGGTGAGGAGTTTCCAGACCTCAGAGACAGAGGAAGCTC 154
      *      *      *      *      *      *      *      *      *

      *      *      *      *      *      *      *      *      *
1201 atcacagctcatgtggaacctctgctagccagacaactgtattactttgctcaaaaaaacactggacatttctgagggggtacagagttacctgaacacg 1300
      |
153 ATCACAGCTCATGTGGAACCTCTGCTAGCCCAACCACTGTATTACTTTGCTCAACAAAACACTGGACATTTCCTGAGGGGCTACGAGTTACCTGAACACG 54
      *      *      *      *      *      *      *      *      *

      *      *      *      *      *      *      *
1301 ttaccactccagattaccacgctccctccgtcattcttccatccaagagtga 1353
      |
53 TTACCCTCCAGATTACCACCGCTCCCTCCGTCTTCTCCATCCAAGAGTGA 1

```

Abbildung 9. Das Sequenzierungsergebnis der Mutante P411-412

In Rot ist die geänderte Sequenz in der Mutante P411-412 dargestellt. Bei dem dargestellten Alignment stellt die obere Sequenz die ursprüngliche IRF4-Sequenz dar und die untere die der Mutante P411-412.

Die im Experiment verwendeten Kontrollvektoren und generierten IRF4-Mutanten sind folgende

Bezeichnung	Aufklärung
pGFP	pMIG -Leervektor (Negativkontrolle)
pIRF4	<i>Irf4</i> enthaltender pMIG (Positivkontrolle)
d421-450	<i>Irf4</i> -Mutante, deren für aa 421-450 kodierendes Genstück fehlt, in pMIG
d411-450	<i>Irf4</i> -Mutante, deren für aa 411-450 kodierendes Genstück fehlt, in pMIG
d416-420	<i>Irf4</i> -Mutante, deren für aa 416-420 kodierendes Genstück fehlt, in pMIG

d411	<i>Irf4</i> -Mutante, deren für aa 411 kodierendes Genstück fehlt, in pMIG
d412	<i>Irf4</i> -Mutante, deren für aa 412 kodierendes Genstück fehlt, in pMIG
d413	<i>Irf4</i> -Mutante, deren für aa 413 kodierendes Genstück fehlt, in pMIG
d414-415	<i>Irf4</i> -Mutante, deren für aa 414-415 kodierendes Genstück fehlt, in pMIG
d2-420	<i>Irf4</i> -Mutante, deren für aa 2-420 kodierendes Genstück fehlt, in pMIG
R411P	<i>Irf4</i> -Mutante, deren aa 411 durch Prolin ersetzt wurde, in pMIG
P411-412	<i>Irf4</i> -Mutante, deren aa 411/412 durch Prolin/Prolin ersetzt wurde, in pMIG
P411-413	<i>Irf4</i> -Mutante, deren aa 411-413 durch Prolin ersetzt wurde, in pMIG
R411A	<i>Irf4</i> -Mutante, deren aa 411 durch Alanin ersetzt wurde, in pMIG
A412-413	<i>Irf4</i> -Mutante, deren aa 412-413 durch Alanin/Alanin ersetzt wurde, in pMIG
A411-413	<i>Irf4</i> -Mutante, deren aa 411-413 durch Alanin ersetzt wurde, in pMIG
A414-415	<i>Irf4</i> -Mutante, deren aa 414-415 durch Alanin/Alanin ersetzt wurde, in pMIG
R411K	<i>Irf4</i> -Mutante, deren aa 411 durch Lysin ersetzt wurde, in pMIG
R411E	<i>Irf4</i> -Mutante, deren aa 411 durch Glutaminsäure ersetzt wurde, in pMIG

4.1.2 Überexpression der Mutanten in murinen T-Zellen

Um den Effekt von IRF4 (oder seinen Mutanten) zu testen, wurde die retrovirale Überexpression verwendet. Dabei wurde die jeweilige Plasmid-DNA in Retroviren verpackt und mit Hilfe dieser in die IRF4 KO T-Zellen transduziert. Das Plasmid „pIRF4“, wie auch alle anderen für Mutanten kodierenden Plasmide, wurde mit Hilfe einer Kalzium-Phosphat-Lösung in HEK-Zellen transduziert. Des Weiteren wurden dabei Plasmide, welche die Verpackungsproteine für Retroviren kodieren, mit transfiziert. Somit konnte innerhalb von 48 Stunden ein Virus enthaltender Kultur-Überstand generiert werden, wobei die Viren das im jeweiligen pMIG-Plasmid kodierte IRF4 Mutantengen enthielten. Die das Virus enthaltenden 24- bzw. 48- stündigen Überstände wurden danach als Transduktionsmaterial für Maus T-Zellen verwendet. Hierbei wurde die Qualität der Virenüberstände durch die Messung des Anteils der grünen HEK-Zellen bestimmt, da die mit dem Plasmid erfolgreich infizierten Zellen gleichzeitig mit der IRF4 Mutante über eine IRES Sequenz auch grün fluoreszierendes GFP exprimieren. Im Experiment wurden die Virenüberstände verwendet, bei denen die HEK Zellen Transfektionsraten von über 50 % aufwiesen (Abb. 10).

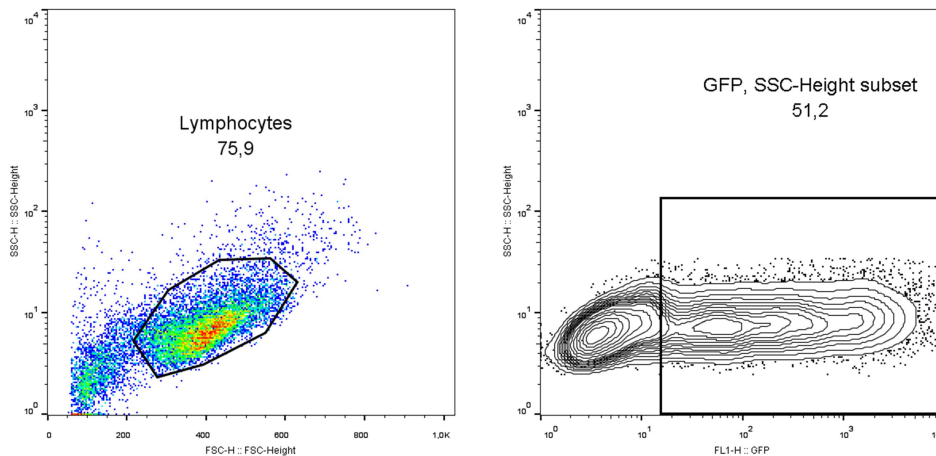


Abbildung 10. Die FACS-Analyse der „pGFP“ infizierten HEK-Zellen.

Die HEK-Zellen wurden mit dem pMIG-Vektor pGFP und den Verpackungsplasmiden pCGP und pEco mittels der Kalziumphosphat-Methode transfiziert und nach 48h analysiert. (A): Selektion der lebendigen HEK-Zellen über die Größe (x-Achse) und Granularität (y-Achse). Die Zahlenwerte entsprechen dem prozentualen Anteil der eingegrenzten Zellpopulation. (B): Darstellung der transfizierten HEK-Zellen innerhalb der in (A) selektierten Zellpopulation über die Granularität (y-Achse) und grüne Fluoreszenz (x-Achse). Der Zahlenwert entspricht dem prozentualen Anteil der GFP⁺ Zellpopulation.

Nach der Infektion mit Retroviren enthaltenden Überständen der HEK-Zellen exprimieren auch Virus-infizierte T-Zellen GFP zusammen mit der IRF4-Mutante und sind daher wie die HEK-Zellen im FITC-Kanal der FACS-Messung detektierbar. In dieser Arbeit wurde daher der Effekt einer IRF4-Mutante auf die jeweilige Differenzierung von T-Zellsubpopulationen ausgewertet, indem der Anteil der Zytokin produzierenden Zellen getrennt für GFP exprimierende und GFP negative Zellen berechnet wurde (siehe Abb. 6).

4.2 Kinetik der Differenzierung der T-Zellsubpopulationen

Nach dem Kontakt mit dem Antigen- und kostimulatorischen-Signalen fangen die T-Zellen an, sich in verschiedene Subpopulationen zu differenzieren. Von den bis jetzt bekannten T-Zellsubpopulationen sind die Th/c2, Th/c9 und Th/c17 Zellen die am meisten untersuchten Populationen, deren Differenzierung von IRF4 abhängig ist. Zytokinproduktion ist ein wichtiger Marker der T-Zelldifferenzierung, da die meisten T-Zellen durch ihre spezifischen Zytokine zum Immuneffekt beitragen und daher auch

durch diese definiert werden. Neben dem Muster sind auch die Menge und Dauer der Zytokinproduktion nicht identisch für jede T-Zellsubpopulation. Um den Effekt der IRF4-Mutanten quantitativ präzise ermitteln zu können, wurde zunächst die Kinetik der Zytokinproduktion in den verschiedenen Th-Zellsubpopulationen in IRF4 kompetenten *irf4*^{+/-} Kontroll-T-Zellen betrachtet.

Wie in der Einleitung erwähnt ist, fördert das Zytokin IL-4 die Differenzierung von Th/c2-Zellen, aktivieren IL-4 und TGF- β das Th/c9-Differenzierungsprogramm, während bei der Differenzierung von Th/c17-Zellen IL-6 und TGF- β wichtig sind.

CD4⁺T-Zellen aus *irf4*^{+/-}Mäusen wurden unter Th2-, Th9- und Th17-Differenzierungsbedingungen kultiviert und der zeitliche Ablauf der Produktion der linienspezifischen Zytokine (IL-4 und IL-13 in Th2-, IL-9 in Th9- und IL-17A in Th17-Bedingungen) nach jeweils 4 stündiger Restimulation mit PMA/Ionomycin durch FACS-Messung analysiert (Abb.11). Die IL-9-Produktion von Th9-Zellen erreichte am Tag 2 das höchste Niveau und sank danach. Die IL-4 und IL-13 Spiegel bei Th2-Zellen stiegen bis Tag 6 an, wobei die Werte am Tag 2 und 3 unverändert blieben. Das Muster der IL-13-Produktion zeigte die gleiche Tendenz wie das von IL-4, aber das Ausmaß der IL-13-Färbung war an jedem gemessenen Tag größer als das von IL-4. Die IL-17A-Produktion von Th17-Zellen stieg mit der Zeit an, aber nach dem 3-ten Tag war keine wesentliche Änderung mehr zu sehen. Diese Ergebnisse entsprachen der Tendenz der anderen Forscher (Tan et al., 2010).

Aufgrund dieser Untersuchungen wurde es entschieden, die Th/c9-Differenzierung am Tag 2 und die Th/c2- und Th/c17- Differenzierungen am Tag 3 zu bestimmen, da die linienspezifischen Zytokine dann bei ähnlich langer Inkubationszeit eine hohe Ebene erreichten, bei wenig beeinträchtigter Zelllebensdauer (die Daten der Zelllebensdauer wurden hier nicht gezeigt). Darüber hinaus wurde statt der IL-4- die IL-13-Produktion als Zytokinmarker für die Th2-Differenzierung bei der FACS-Analyse gewählt, da dieser Parameter auf das Differenzierungssignal empfindlicher als der IL-4-Wert reagierte.

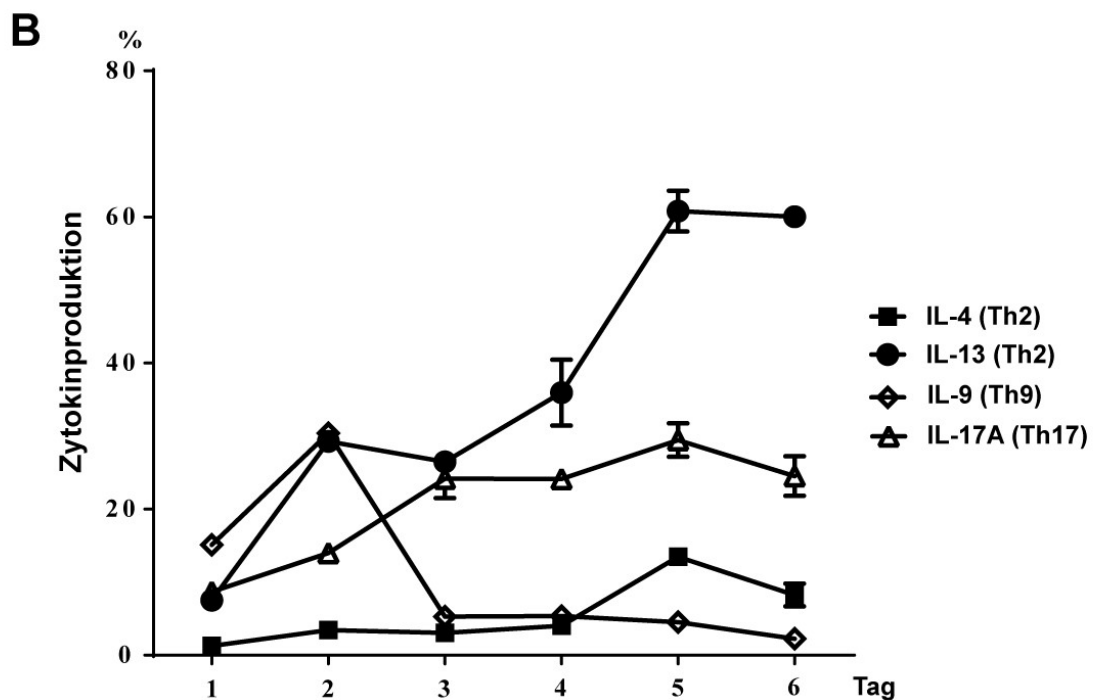
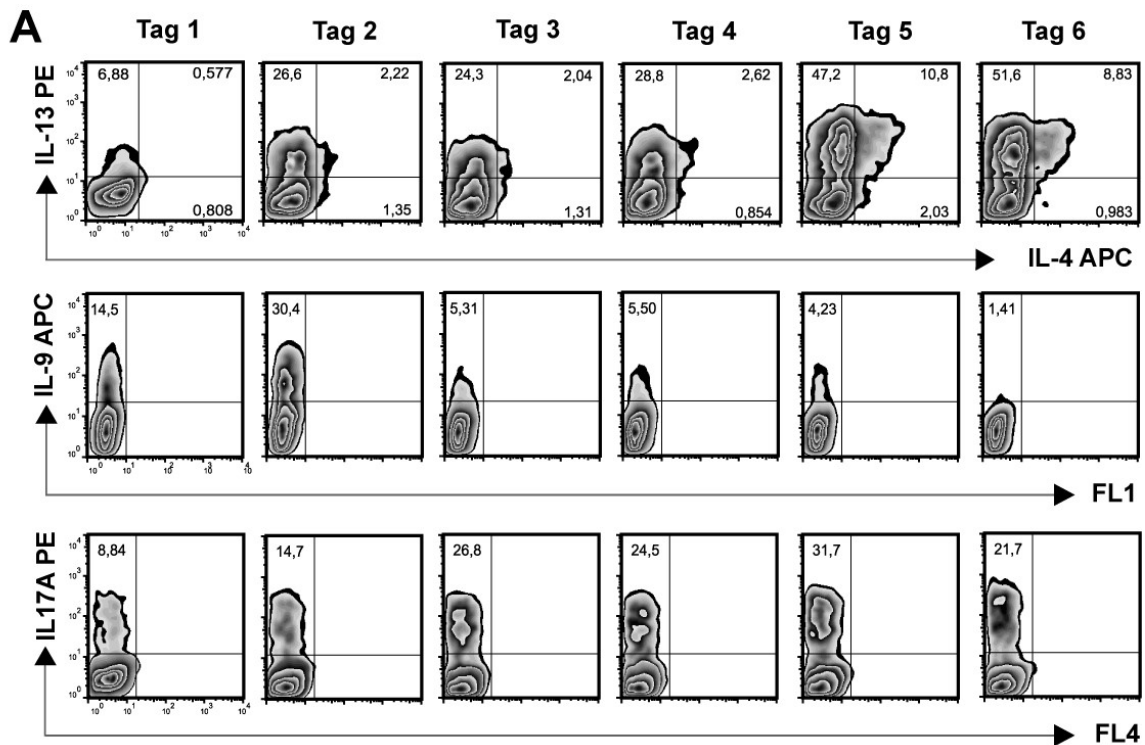


Abbildung 11. Kinetik der Th2, Th9 und Th17-Differenzierungen von *Irf4*^{+/-} CD4⁺-Zellen.

(A, B): Die CD4⁺-Zellen von *Irf4*^{+/-}-Mäusen wurden in Th/c2, Th/c9 und Th/c17-Differenzierungsbedingungen 6 Tage lang kultiviert. (A): Färbung der Zellen mit anti-IL-4-APC und anti-IL-13-PE (Th2), anti-IL-9-APC (Th9) und anti-IL-17A-PE (Th17) Antikörpern. Der FL4 Kanal war bei der Färbung von Th9 und Th17 Zellen nicht mit einem Antikörper belegt. Die Messungen wurden an jedem angegebenen Tag nach Restimulation mit PMA/Ionomycin durchgeführt. Die Zahlenwerte entsprechen dem prozentualen Anteil der jeweiligen

eingegrenzten Zellpopulation. (B): Graphische Darstellung der Kinetik der Produktion von IL-4, IL-13, IL-9 und IL-17A in den jeweiligen Th-Subtypen. Die Fehlerbalken entsprechen der SD der Messwerte aus Duplikatbestimmungen. Das Experiment wurde zweimal wiederholt mit ähnlichem Ergebnis.

4.3 Untersuchung der Funktionen von IRF4-Mutanten bei der T-Zelldifferenzierung

Um die Rolle der IRF4-Mutanten auf die T-Zell-Differenzierung zu untersuchen, wurden diese mittels Retroviren in T-Zellen der *irf4*^{-/-}-Mäuse transduziert. Zusammen mit pGFP- und pIRF4- infizierten *irf4*^{-/-} T-Zellen wurden die Mutanten-infizierten T-Zellen in Th/c2, Th/c9 und Th/c17-Differenzierungsbedingungen kultiviert und als Marker für die jeweiligen T-Zell-Subtypen die Expression der linienspezifischen Zytokine, sowie die Expression des Chemokin-Rezeptors CCR6 und der Mastertranskriptionsfaktoren analysiert.

4.3.1 Die Mutante d421-450

In den früheren Publikationen wurde gezeigt (Brass et al., 1996; Remesh et al., 2015), dass der Transkriptionsfaktor IRF4 in der C-terminalen Region eine Domäne besitzt, welche aus 30 aa besteht und autoinhibitorisch für die Funktion von IRF4 wirkt. Diese Domäne stört die Bindung der DNA-Bindungsdomäne DBD des IRF4 an das Gen, da sie in der 3-dimensionalen IRF4 Struktur räumlich nah an der DBD positioniert ist und mit der interagiert (Brass et al., 1996). Die publizierten Daten betrachteten die Rolle dieser Domäne mit dem Fokus auf die strukturelle Analyse. Bis jetzt ist aber keine Publikation erschienen, in welcher die Funktion dieser Domäne im Zusammenhang mit der T-Zelldifferenzierung beforscht wurde.

Da IRF4 ein Schlüsselfaktor für die Differenzierung der meisten Th-Zellsubtypen ist, stellten wir die Hypothese auf, dass die Deletion oder die funktionelle Inaktivierung dieser Domäne zu einer erhöhten IRF4 Funktion und damit gesteigerter Differenzierung der von IRF4-gesteuerten Th-Zellsubtypen führen kann. Um diese Theorie zu überprüfen, wurde durch Mutagenese eine IRF4-Mutante ohne autoinhibitorische

Domäne (d421-450) hergestellt und ihr Effekt auf die T-Zell-Differenzierung in *irf4*^{-/-} T-Zellen im Vergleich zu den Kontrollvektoren pGFP und pIRF4 getestet.

Es wurde ebenfalls publiziert, dass die 10 aa vor der autoinhibitorischen Domäne (410-420) eine wichtige Rolle in der Interaktion mit Transkriptionsfaktoren PU.1 und NFATc2 spielen (Brass et al., 1999; Rengarajan et al., 2002), da das Ausschneiden dieser Region eine abgeschwächte Bindungskapazität zu diesen Faktoren zur Folge hat. Da IRF4 seine Wirkung meistens durch die Interaktion mit dem jeweiligen Partnertranskriptionsfaktor entwickelt, wurde daher von mir auch noch getestet, ob die Deletion von 410-420 einen Verlust der IRF4 Funktion zur Folge hat. Zu diesem Zweck wurde noch eine andere Mutante (d411-450) synthetisiert und analysiert, bei der zusätzlich zur autoinhibitorischen Domäne auch diese kritischen Aminosäuren fehlen.

4.3.1.1 Die Mutante d421-450 verstärkt die Th-Zelldifferenzierung

4.3.1.1.1 Die Mutante d421-450 erhöht die Zytokinproduktion in Th-Zellen

4.3.1.1.1.1 FACS-Analyse der Zytokinproduktion

Für die FACS-Analyse der Zytokinproduktion wurden die *in vitro* transduzierten und differenzierten naiven Th-Zellen mit PMA, Ionomycin und Brefeldin A für 4 Std. restimuliert und mit 2 % Formaldehyd fixiert. Es folgte die intrazelluläre Zytokinfärbung.

Wie in den Abbildungen 12 und 13 zu sehen ist, ist die Mutante d421-450 in der Lage, die Zytokinproduktion von IL-17A unter Th17-Bedingungen deutlich zu erhöhen. Auch die IL-9-Produktion steigerte sich leicht von pIRF4- gegenüber d421-450-transduzierten Th9-Subtypen. Der Spiegel von IL-13 in Th2-Zellsubtypen zeigte dagegen eine leichte Reduktion im Vergleich zu IRF4-transduzierten Zellen, aber dieser Befund war statistisch nicht signifikant. Es ist auch festzuhalten, dass bei der IL-13 Färbung die Trennung positiver und negativer Zellen unscharf war und damit die Festlegung der Prozentzahlen etwas problematisch. Das Ergebnis zeigt, dass die autoinhibitorische Domäne ihre inhibitorische Wirkung vor allem in Th17-Zelldifferenzierungsprogrammen entfaltet, während in diesem Testsystem Th2- und Th9-Zellen geringer beeinflusst werden. In allen getesteten Th-Zellsubtypen brachte die Mutante d411-450 keinerlei Zytokinproduktionen zustande, d.h., die aa 411-420 von

IRF4 sind tatsächlich entscheidend wichtig für die Th-Zelldifferenzierungen, selbst in der Abwesenheit der autoinhibitorischen Domäne.

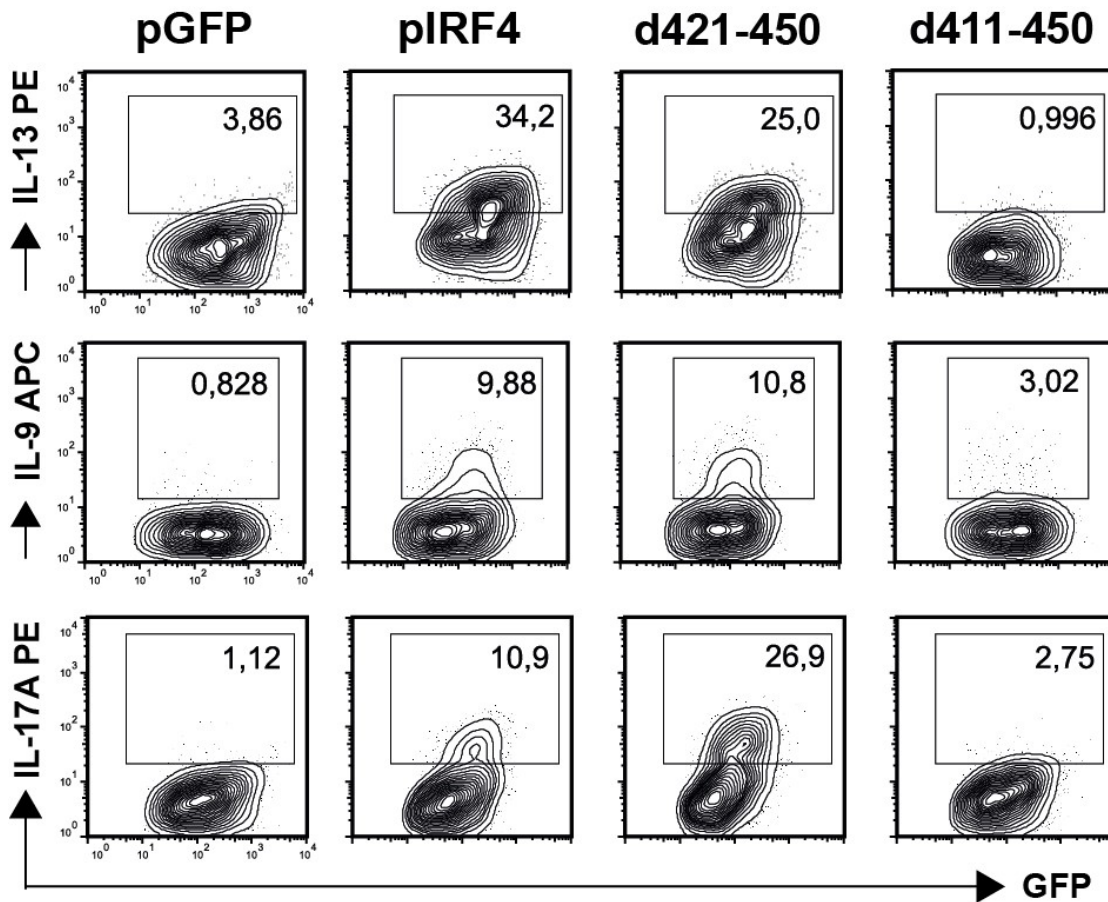


Abbildung 12. FACS-Analyse der Zytokinproduktion von mit den IRF4-Mutanten d421-450 und d411-450 transduzierten Th-Zellsubtypen.

Die Mutanten d421-450 sowie pGFP, pIRF4 und d411-450 wurden jeweils in naive *irf4*^{-/-} Th-Zellen transduziert, die danach unter Th2-, Th9- und Th17-Differenzierungsbedingungen kultiviert und schließlich mit PMA, Ionomycin und Brefeldin A für 4 Std. restimuliert wurden. Diese Zellen wurden durchflusszytometrisch auf die Expression von GFP untersucht, nur die GFP⁺-Zellpopulationen wurde gated, hier dargestellt und anhand der gefärbten Zytokinmarker charakterisiert. Für die IL-13 Produktion in Th2-Zellen wurde α IL-13-PE Antikörper verwendet, α IL-9 APC Antikörper für die Detektion von IL-9 in Th9-Zellen und α IL-17A PE Antikörper für die IL-17A Färbung in Th17-Zellen. Die Zahlenwerte entsprechen dem prozentualen Anteil der jeweiligen eingegrenzten Zellpopulation. Die Daten repräsentieren einen Versuch mit identischen Mauszellen. Die Statistik aus Mehrfachversuchen ist in Abb. 13 dargestellt.

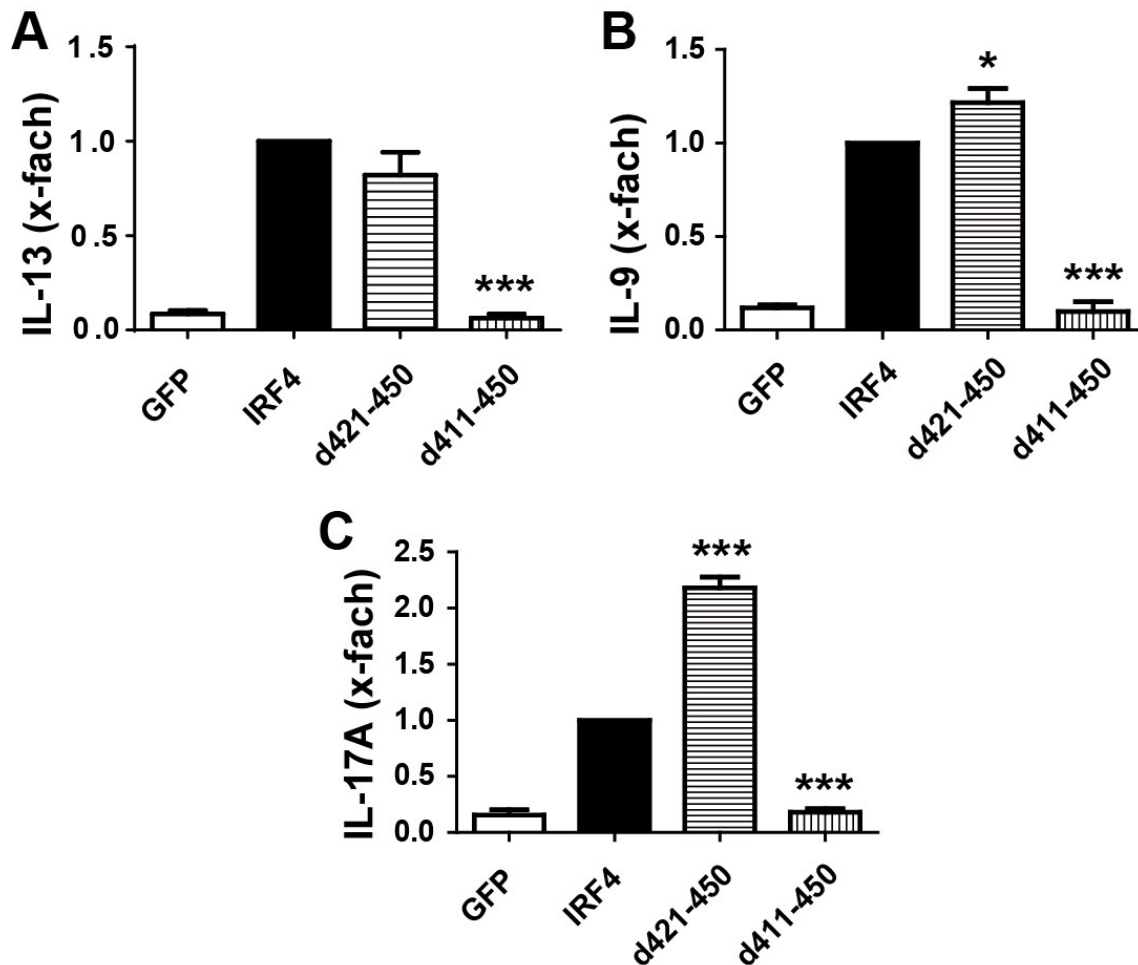


Abbildung 13. Zusammenfassung der FACS-Analyse der IRF4-Mutanten d421-450 und d411-450 bei der Zytokinproduktion von Th-Zellen

(A-C): Die aufgenommenen FACS-Daten wurden mittels dem FlowJo-Programm analysiert. Die GFP⁺-Population wurde in der Dot-Plot-Darstellung gated und danach der Prozentuale Anteil der Zytokinproduzierenden Zellen berechnet. Diese Werte für die Mutanten wurden jeweils durch denjenigen für die pIRF4- Probe geteilt und als Faktor kalkuliert. Der Wert für pIRF4 wurde im jeweiligen Experiment auf 1 gesetzt. (A): Effekte auf die IL-13-Produktion unter Th2-Bedingungen. (B): Effekte auf die IL-9-Produktion unter Th9-Bedingungen. (C): Effekte auf die IL-17A-Produktion unter Th17-Bedingungen. Das Experiment wurde mindestens dreimal wiederholt mit ähnlichem Ergebnis. Die jeweils erzielten Faktoren wurden hier als Mittelwert \pm SD zusammengefasst. Die Fehlerbalken entsprechen der SD der Messwerte. *: $p < 0,05$, ***: $p < 0,001$ im Vergleich zu pIRF4.

4.3.1.1.2 ELISA-Analyse der Zytokinproduktion

Die bisher gezeigten Daten entsprechen einer Momentaufnahme. Die von den Th-Zellen produzierten Zytokine werden allerdings während der Restimulation permanent durch

die Zellmembran in die Umgebung ausgeschüttet, so dass ihr Spiegel auch dort durch einen ELISA gemessen werden kann. Um die Zytokinproduktion im Medium quantitativ präzise zu analysieren, wurde eine gleiche Zahl von Zellen pro Probe in dem PMA und Ionomycin enthaltenden RPMI-Medium für 4 Std. kultiviert und deren Überstände zum Test verwendet. Hier erfolgte die Inkubation allerdings ohne Brefeldin A, um die Sekretion der Zytokine durch die Zellen zuzulassen. Die Abbildungen 14 und 15 zeigen die Zusammenfassung der Ergebnisse aus mehreren Experimenten dieser Art. Dabei ergab sich zunächst der überraschende Befund, dass der Wert von IL-5 bereits in den pGFP-transduzierten Kontrollzellen hoch gewesen ist. Um klar zu stellen, ob dieser hohe Wert darauf zurückzuführen ist, dass *irf4*^{-/-}-Mäuse allgemein einen hohen IL-5-Grundwert haben oder ob IL-5 bedingungsabhängig nur in differenzierten Th2-Zellen hochreguliert ist, wurden die IL-5 Werte in Zellkulturüberständen von verschiedenen Th-Zellsubtypen nach Transduktion mit pGFP, pIRF4 und der Mutante d421-450 analysiert. Wie in der Abb. 14 zu sehen ist, zeigten nur die unter Th2-Bedingung kultivierten Zellen einen hohen IL-5-Wert. Dies bedeutet, dass die IL-5-Produktion unter Th2 Differenzierungsbedingungen in starkem Maß auch in *irf4*^{-/-}-T-Zellen nachweisbar ist, und daher nicht nur durch IRF4, sondern auch IRF4-unabhängig durch Th2 bedingungspezifische Faktoren reguliert werden kann. Dennoch zeigt die Abb. 14 auch eine zusätzliche, von IRF4 abhängige Stimulation der IL-5-Produktion. Betrachtet man nun mit diesen Vorbemerkungen Abb. 15, so erkennt man auch in den ELISA-Daten die gleiche Tendenz wie bei der FACS-Analyse. Die Mutante d421-450 steigert die Zytokinproduktion erneut besonders unter Th17 Bedingungen. Dies gilt neben IL-17A auch für die Produkte IL-17F und IL-21. Wie bei der FACS Analyse, findet man eine leichte (hier nicht signifikante) Steigerung von IL-9 bei Th9 Zellen. Im Gegensatz zur FACS Analyse findet man im ELISA auch eine Steigerung der Th2 Zytokinproduktion. Wie erwähnt, war die FACS Analyse von IL-13 etwas problematisch, während für IL-4 und IL-5 noch deutlich schlechtere FACS Darstellungen erhalten wurden (Daten nicht gezeigt). Daher ist in diesem Fall die ELISA-Analyse vermutlich die sensitivere Testmethode. Wie bei der FACS Analyse, verschwindet die Zytokinproduktion bei zusätzlichem Fehlen der aa 411-420.

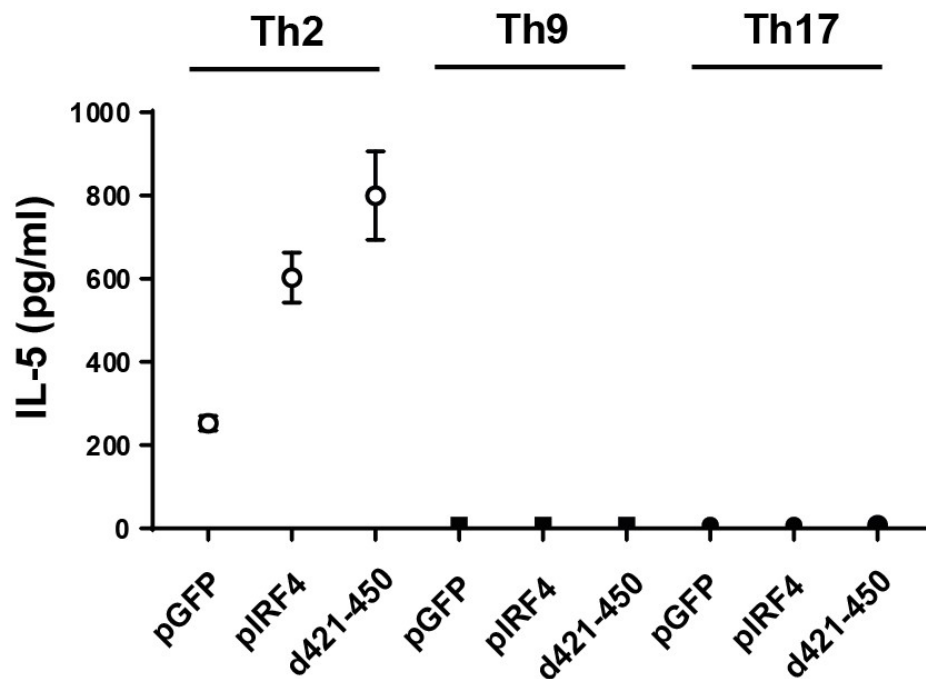


Abbildung 14. IL-5-Expression in verschiedenen Th-Zellsubtypen

Die mit d421-450 sowie pGFP und pIRF4 transduzierten naiven *irf4*^{-/-}-T-Zellen wurden jeweils in Th2, Th9- und Th17 -Differenzierungsbedingungen kultiviert, mit PMA und Brefeldin A für 4 Std. restimuliert und die Überstände auf den Gehalt an IL-5 per ELISA gemessen. Die Fehlerbalken entsprechen der SD der Messwerte in Duplikaten. Das Experiment wurde zweimal wiederholt mit ähnlichem Ergebnis.

Zusammenfassend deuten die Daten erneut darauf hin, dass die Deletion der autoinhibitorischen Domäne die Zytokinproduktion insbesondere von Th-17-Zellen hochtreibt.

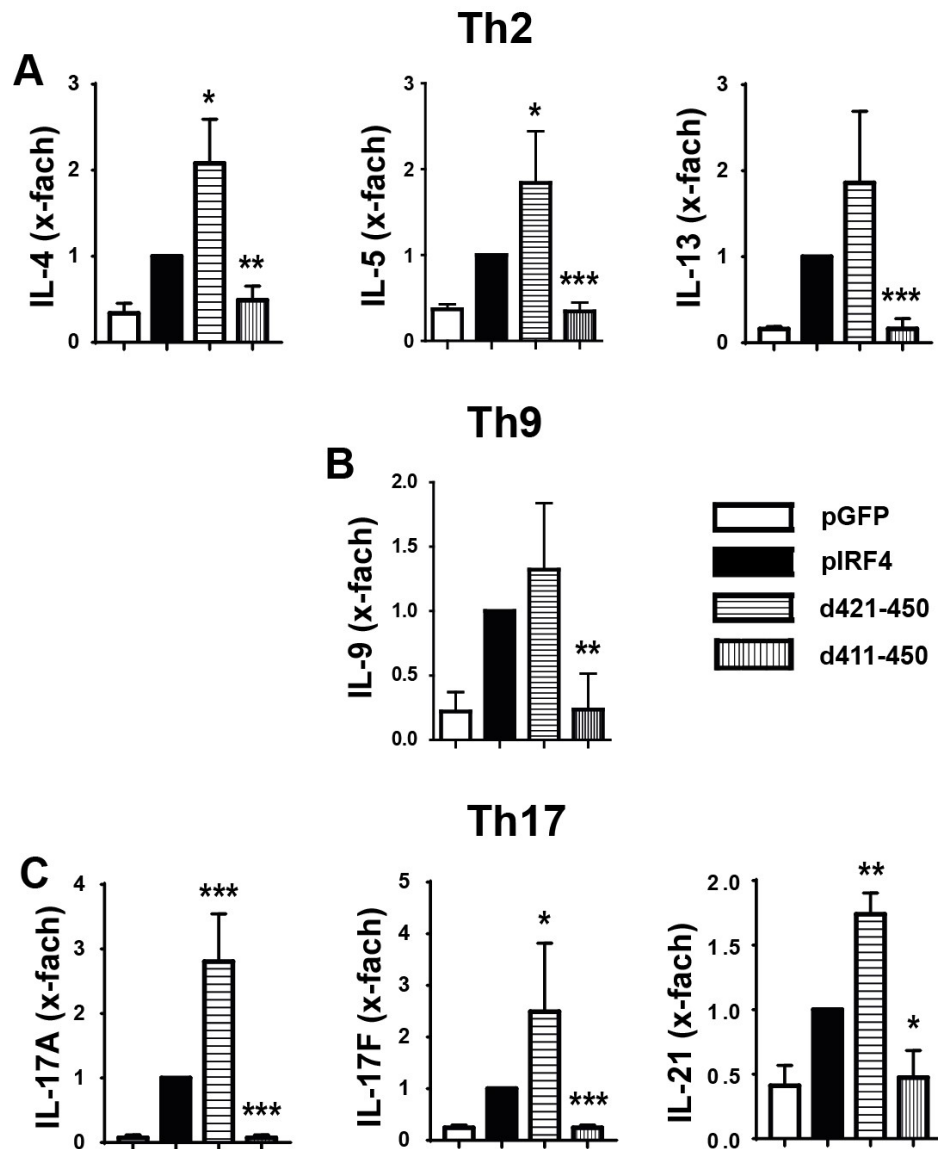


Abbildung 15. Zytokinproduktionen (ELISA) nach Transduktion mit IRF4 und den Mutanten d421-450 und d411-450 in verschiedenen Th-Zellsubpopulationen.

(A-C): Nach Transduktion von *irf4*^{-/-} - Th-Zellen mit den erwähnten Mutanten und Kultivierung unter den entsprechenden Bedingungen wurden gleiche Mengen an Zellen mit dem PMA und Ionomycin enthaltenden frischen RPMI-Medium für 4 Std. restimuliert. Die Messungen erfolgten mit den Überständen. Die Messwerte der pIRF4-Proben wurden auf eins gesetzt und die Werte der Mutanten drauf bezogen. Dadurch wurden die Effekte der Mutanten auf die Zytokinproduktion als Faktor kalkuliert. (A): Th2-Zytokinproduktion (IL-4, IL-5, IL-13) unter Th2-Bedingungen. (B): IL-9-Produktion unter Th9-Bedingungen. (C): Th17-Zytokinproduktion (IL-17A, IL-17F, IL-21) unter Th17-Bedingungen. Das Experiment wurde mindestens dreimal wiederholt mit ähnlichem Ergebnis. Die jeweils erzielten Faktoren wurden hier als Mittelwert \pm SD zusammengefasst. Die Fehlerbalken entsprechen der SD der Messwerte. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$ im Vergleich zu pIRF4.

4.3.1.1.2 Die Mutante d421-450 steigert die CCR6-Expression in Th17-Zellen

Es wurde berichtet, dass Th17-Zellen auf der Oberfläche verschiedene Chemokinrezeptoren exprimieren, die Homing und Migration dieser Zellen steuern. Davon ist CCR6 charakteristischerweise in Th17-Zellen von Mensch und Maus exprimiert (Wang et al., 2009). Die Frage stellte sich, ob dieser Oberflächenmarker in Th-Zellen wie die intrazellulären Zytokinproteine IRF4-abhängig reguliert und bei der Zuführung von d421-450 hochreguliert wird. Um dies zu beantworten, wurden die transduzierten naiven Th-Zellen nach der Differenzierung in die Th17-Richtung oberflächlich anhand von anti-CCR6-APC gefärbt und die Expression untersucht.

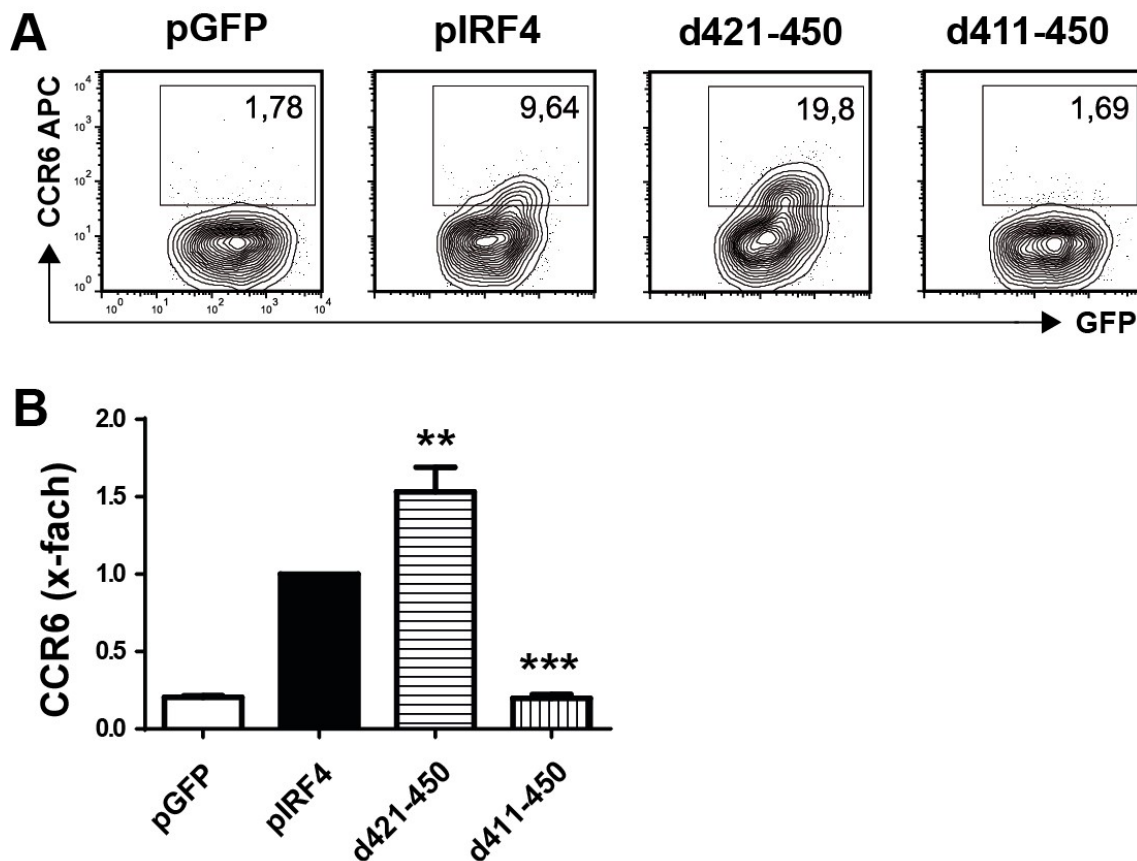


Abbildung 16. Durch IRF4 und dessen Mutanten d421-450 und d411-450 vermittelte CCR6-Expression in Th17-Zellsubpopulationen.

(A, B): Die d421-450 sowie pGFP, pIRF4 und d411-450 transduzierten naiven *irf4*^{-/-}-T-Zellen wurden jeweils in Th17 -Differenzierungsbedingungen kultiviert. Diese Zellen wurden durchflusszytometrisch auf die Expression von GFP untersucht, nur die GFP⁺-Zellpopulationen wurde gated, hier dargestellt und anhand der Expression des Oberflächenmarkers CCR6 charakterisiert. (A) FACS-Daten der CCR6-Expression. Die Daten zeigen einen repräsentativen

Versuch. Die Zahlenwerte entsprechen dem prozentualen Anteil der jeweiligen eingegrenzten Zellpopulation. (B): Zusammenfassung der Effekte der IRF4-Mutanten d421-450 und d411-450 auf die CCR6-Expression in Th17-Zellen. Die Effekte der Mutanten auf die CCR6-Expression wurden analog zu Abb. 13 analysiert. Aufgetragen ist der Faktor der CCR6⁺ Zellen (%), bezogen auf den Wert für pIRF4. Das Experiment wurde fünfmal wiederholt mit ähnlichem Ergebnis. Gezeigt sind die Mittelwerte der Faktoren aus den Einzelexperimenten \pm SD. **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$ bezogen auf pIRF4.

Das Messergebnis bewies, dass in Th17-Zellen auch die CCR6-Expression IRF4-abhängig reguliert wird und dass die Mutante d421-450 in der Lage ist, CCR6 übermäßig zu induzieren. Ähnlich wie in der Zytokinproduktion zeigte die Mutante d411-450 auch keinerlei Aktivitäten für die CCR6-Expression (Abb. 16). Dies zeigt auch anhand der CCR6 Expression eine inhibitorische Funktion der autoinhibitorischen Domäne und die Wichtigkeit der aa 411-420 für die IRF4 Funktion.

4.3.1.1.3 Die Mutante d421-450 steigert die ROR γ t-Expression in Th17-Zellen

ROR γ t ist spezifisch in Th17-Zellen exprimiert und gilt als Mastertranskriptionsfaktor für Th17-Zellen. Frühere Studien hatten gezeigt, dass *irf4*^{-/-}-Zellen eine starke Beeinträchtigung im ROR γ t -Level hatten und dass die retrovirale Überexpression von ROR γ t in *irf4*^{-/-}-Zellen deren vermindertes Niveau im IL-17-Phänotyp nur eingeschränkt retten konnte (Huber et al., 2008). Das bedeutet, dass ROR γ t unter dem Signalweg von IRF4 liegt und gibt einen Hinweis darauf, dass der IRF4-Mutanten-abhängige Th17-Phänotyp in transduzierten *irf4*^{-/-}-Zellen zumindest teilweise auf die unterschiedliche Regulierung von ROR γ t zurückzuführen sein kann. Für die Sicherstellung dieser Theorie wurden die in Th17-Bedingungen kultivierten Zellen mit PMA, Ionomycin und Brefeldin A für 4 Std. restimuliert und für eine qPCR zur Bestimmung der Expression von ROR γ t pelletiert.

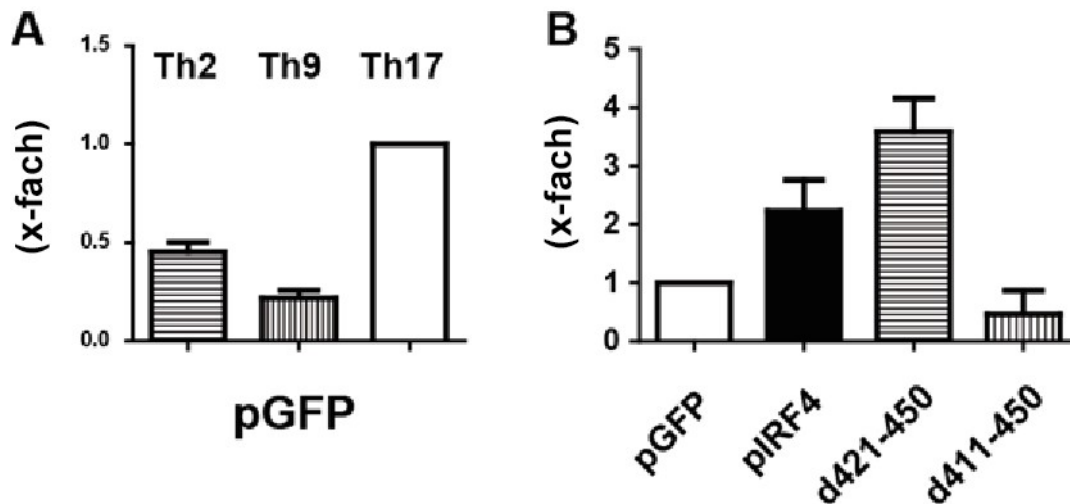


Abbildung 17. Durch die IRF4-Mutanten d421-450 und d411-450 in Th17-Zellpopulationen induzierte RORγt -Expression.

(A): pGFP transduzierte naive *irf4*^{-/-}-T-Zellen wurden jeweils in Th2-, Th9- und Th17-Differenzierungsbedingungen kultiviert. (B): Zusätzlich wurden d421-450, pIRF4 und d411-450 transduzierte Zellen unter Th17 Bedingungen inkubiert. (A, B): Anschließend wurden die Zellen mit PMA, Ionomycin und Brefeldin A für 4 Std. restimuliert. Nach dem 3-maligen Waschen mit PBS-Puffer wurden die Zellen pelletiert, Lysate generiert, Gesamt-RNA gereinigt und diese per qPCR auf die RORγt -Expression hin untersucht. Die Th17-Werte der pGFP-Proben wurden auf eins gesetzt und die Ergebnisse anderer Mutanten darauf bezogen. Die Fehlerbalken entsprechen der SD der Messwerte. Das Experiment wurde zweimal wiederholt mit ähnlichem Ergebnis. Die jeweils in Duplikat-Bestimmungen erzielten Mittelwerte der Faktoren wurden hier als Gesamt- Mittelwert \pm SD zusammengefasst.

Wie in der Abbildung 17 B. zu sehen ist, wurde durch die Mutante d421-450 die RORγt -Expression gegenüber der Aktivität von pIRF4 gesteigert. Dagegen zeigte die Mutante d411-450 erneut keinerlei Aktivität. Dabei ist zu beachten, dass wie die IL-5 Produktion (siehe Abb. 14) auch die RORγt Expression partiell IRF4-unabhängig reguliert wird und daher auch nach Transduktion mit pGFP in Th17 Zellen höher war als in Th2 und Th9 Zellen (Abb. 17 A).

Alle bisherigen Ergebnisse in Bezug auf die Mutanten d421-450 und d411-450 deuten darauf hin, dass (1) IRF4 in seiner C-terminalen Region tatsächlich eine aus 30 aa bestehende autoinhibitorische Domäne besitzt, (2) die Deletion dieser Domäne zur Erhöhung der Th17-Differenzierung führt und (3) die 10 aa vor dieser Domäne von entscheidender funktionaler Bedeutung für die IRF4 Aktivität und Th-Zelldifferenzierung sind.

4.3.1.2 Die Mutante d421-450 verstärkt die Tc17-Zelldifferenzierung

Die MHC-Klasse-I restringierten Tc-Zellen lassen sich ähnlich wie Th-Zellen in verschiedene Subtypen unterteilen, mit den Bezeichnungen Tc1, Tc2, Tc9 und Tc17. Diese Tc-Zellsubtypen sind durch die Expression der gleichen Zytokine definiert wie bei den korrespondierenden Th-Zellsubtypen (Croft et al., 1994; Huber et al., 2013; Visekruna et al., 2013). Aufgrund der Untersuchungen in Th-Zelldifferenzierungsbedingungen wurden daher in der Folge ähnliche Experimente durchgeführt, um zu wissen, ob die beiden Mutanten d421-450 und d411-450 bei Tc-Zelldifferenzierungen einen vergleichbaren Effekt aufweisen.

Hierfür wurden die naiven *irf4*^{-/-}Tc-Zellen anhand der linienspezifischen Oberflächen Marker (CD8⁺ CD62L⁺ CD44⁻) mittels FACS-ARIA sortiert und in mit aCD3/aCD28 beschichteten Kulturplatten unter den verschiedenen Differenzierungsbedingungen kultiviert. Die Kostimulation mit anti-CD28 erwies sich bei CD8⁺ T-Zellen in Vorexperimenten als essentiell für das Überleben der Zellen (Daten nicht gezeigt). Mit der Zytokinproduktion nach Restimulation wurden wiederum die Differenzierungszustände erfasst.

Die Experimente mit Tc-Zellen lieferten ein vergleichbares Resultat wie bei den Th-Zelluntersuchungen. Die Abbildung 18 zeigt, dass gegenüber pIRF4 die Mutante d421-450 auch in Tc17-Zellen die IL-17A-Zytokinproduktion hochregulierte, während d411-450 kaum fähig war, IL-17A zu induzieren. Leider konnte durch intrazelluläre Färbung weder IL-13 unter Tc2 – noch IL-9 unter Tc9-Bedingungen nachgewiesen werden, so dass hier ein Effekt der Mutanten nicht beurteilbar war (Daten nicht gezeigt).

Die Zytokinmessung per ELISA bestätigte das Ergebnis für Tc17 Zellen. Die IL-17A-Produktion zeigte mit d421-450 eine Steigerung gegenüber pIRF4, während die Mutante d411-450 kein IL-17A induzierte. Im Gegensatz zur intrazellulären Färbung waren im ELISA für IL-9 und IL-13 Messwerte zu generieren. Hier zeigte sich für beide Zytokine keine wesentliche Änderung durch die Mutante d421-450 gegenüber pIRF4. Bei IL-13 in Tc2-Zellen war allerdings zumindest eine leichte Erhöhung zu beobachten. Die Mutante d411-450 war in allen Bedingungen unfähig, die Produktion der untersuchten Zytokine zu induzieren (Abb.19).

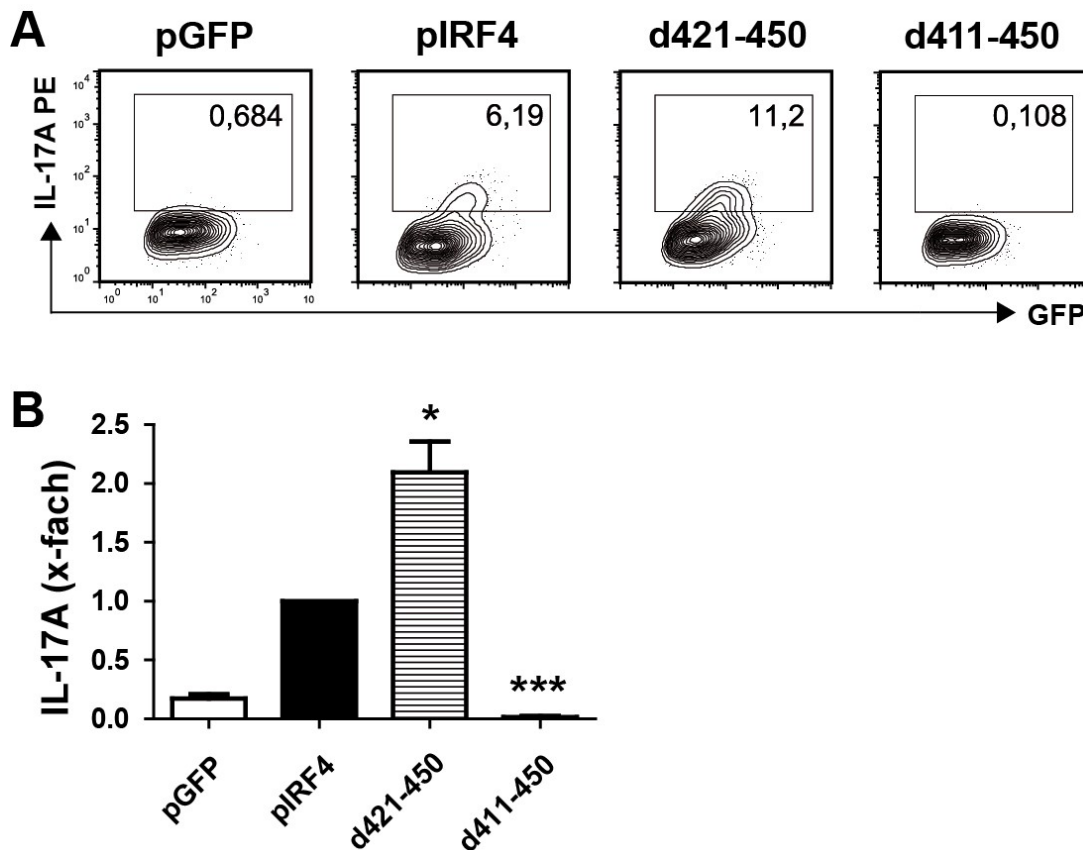


Abbildung 18. FACS-Analyse der IL-17A Produktion von mit den IRF4-Mutanten d421-450 und d411-450 transduzierten *irf4*^{-/-} Tc-Zellen.

(A, B): Die d421-450 sowie pGFP, pIRF4 und d411-450 transduzierten naiven Tc-Zellen wurden ähnlich wie die Th17-Zellen (siehe Abb.12; allerdings zusätzlich mit anti-CD28) behandelt und analysiert. (A): FACS-Daten der IL-17A-Färbung. Die Daten zeigen einen repräsentativen Versuch. Die Zellen wurden durchflusszytometrisch auf die Expression von GFP untersucht, nur die GFP⁺-Zellpopulationen wurde gated, hier dargestellt und deren IL-17A Produktion bestimmt. Die Zahlenwerte entsprechen dem prozentualen Anteil der jeweiligen eingegrenzten Zellpopulation. (B): Grafische Zusammenfassung der Effekte der IRF4-Mutanten d421-450 und d411-450 auf die IL-17A-Produktion von Tc17-Zellen. Der prozentuale Anteil der Zytokin produzierenden Zellen innerhalb der GFP⁺-Population (wie in A) für die Mutanten wurde jeweils durch den Wert für die pIRF4- Probe geteilt und als Faktor kalkuliert. Der Wert für pIRF4 wurde im jeweiligen Experiment auf 1 gesetzt. Das Experiment wurde dreimal wiederholt mit ähnlichem Ergebnis. Die jeweils erzielten Faktoren wurden hier als Mittelwert \pm SD zusammengefasst. Die Fehlerbalken entsprechen der SD der Messwerte. *: $p < 0,05$, ***: $p < 0,001$ im Vergleich zu pIRF4.

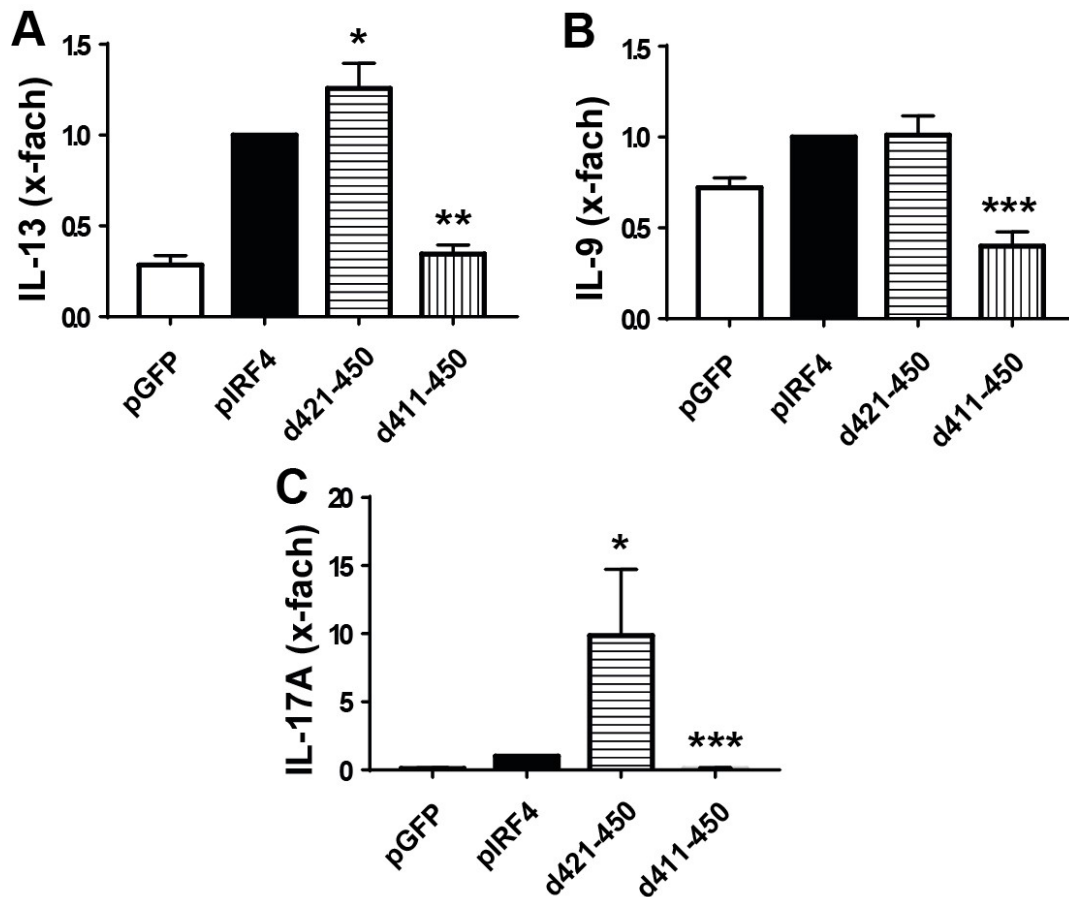


Abbildung 19. Zytokinproduktionen (ELISA) nach Transduktion mit IRF4 und den Mutanten d421-450 und d411-450 in verschiedenen Tc-Zellsubpopulationen.

(A-C): Nach der Kultivierung unter den entsprechenden Bedingungen und Transduktion mit den erwähnten Mutanten wurden die Tc-Zellen wie Th-Zellen behandelt und analysiert (siehe Abb. 15, allerdings zusätzlich mit anti-CD28). (A): IL-13-Produktion unter Tc2-Bedingungen. (B): IL-9-Produktion unter Tc9-Bedingungen. (C): IL-17A-Produktion unter Tc17 Bedingungen. Die Messwerte der pIRF4-Proben wurden auf eins gesetzt und die Werte der Mutanten drauf bezogen. Dadurch wurden die Effekte der Mutanten auf die Zytokinproduktion als Faktor kalkuliert. Das Experiment wurde dreimal wiederholt mit ähnlichem Ergebnis. Die jeweils erzielten Faktoren wurden hier als Mittelwert \pm SD zusammengefasst. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$ im Vergleich zu pIRF4.

Diese Ergebnisse der Tc-Zellexperimente stimmen mit denjenigen der Th-Zellexperimente darin überein, dass auch hier die Rolle der autoinhibitorischen Domäne nochmals bestätigt wird. Wie bei Th-Zellen ist der Effekt der Domäne besonders deutlich unter Tc17 Bedingungen zu erkennen, während Tc2-Zellen kaum und Tc9-Zellen gar nicht beeinflusst werden. Erneut sind die aa 411-420 von entscheidender Wichtigkeit für die IRF4 Wirkung.

4.3.1.3 Proteinexpression durch pIRF4 und seine Mutanten

Um auszuschließen, dass die Verstärkung der T-Zelldifferenzierung durch die Mutante d421-450 nicht einfach durch eine verstärkte Expression auf der Proteinebene zurückzuführen ist, wurden die mit pIRF4 sowie Mutante d421-450 transfizierten HEK-Zellen lysiert und für einen Western Blot vorbereitet.

Wie in der Abb. 20 zu sehen ist, kann man keinen Unterschied zwischen IRF4 und dem Mutante d421-450 in der Menge der Proteinexpression erkennen. Wie zu erwarten, ist nach Transfektion mit pGFP keine IRF4 Bande zu sehen, die zu erkennenden Flecken entsprechen Artefakten. Da die Mutante d421-450 um 30 aa kleiner ist als IRF4, ist ihre Bande im Gel etwas weitergelaufen als die von IRF4.

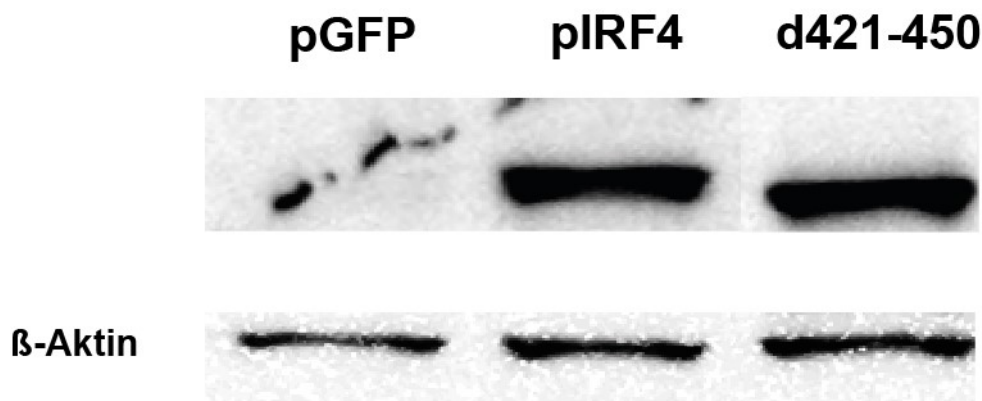


Abbildung 20. Die Expression von IRF4 sowie der Mutante d421-450 in HEK-Zellen
Die HEK-Zellen wurden mit pGFP, pIRF4 und d421-450 mittels der Kalziumphosphat-Methode transfiziert und in RPMI-Medium 2 Tage kultiviert, wobei jeden Tag ein Medienwechsel durchgeführt wurde. Danach wurden die Zellen pelletiert, lysiert und für den Western Blot aufgetragen. Die Detektion von IRF4 und seiner Mutante d421-450 erfolgte durch die Färbung mit dem anti-IRF4 (Klon F-4) mouse monoklonalen IgG2a Antikörper und Goat anti-mouse IgG-HRP und zur Detektion von β-Aktin wurde monoklonaler anti-β-Aktin (Klon AC-15) mouse IgG1 Antikörper und Goat anti-mouse IgG-HRP verwendet. Das Experiment wurde zweimal wiederholt.

4.3.1.4 Die autoinhibitorische Domäne alleine inhibiert nicht die Th-Zelldifferenzierungen

Das Ergebnis, dass die Deletion der autoinhibitorischen Domäne von IRF4 die Th/c17-Differenzierungen erhöht, ließ die Frage zu, ob diese Domäne alleine fähig ist, den Effekt von IRF4 auf Th/c17-Zelldifferenzierungen zu unterbinden oder mit dem in der WT-Zelle vorhandenen IRF4 zu konkurrieren. Um das zu überprüfen, wurde eine Mutante generiert, welche die Aminosäuren zwei bis 420 von IRF4 nicht kodiert (die erste aa ist das notwendige Startcodon; Met) und in den pMIG -Leervektor kloniert. Mittels des etablierten retroviralen Überexpressionssystems wurde es möglich, diese Mutante d2-420 in IRF4 kompetente *irf4*^{+/-}-Zellen zu transduzieren. Der Effekt von d2-420 auf die Th-Zelldifferenzierungen wurde durch das Vergleichen der Zytokinproduktion zwischen den transduzierten GFP⁺- und den negativen GFP⁻-Zellfraktionen bei der FACS-Analyse ausgewertet.

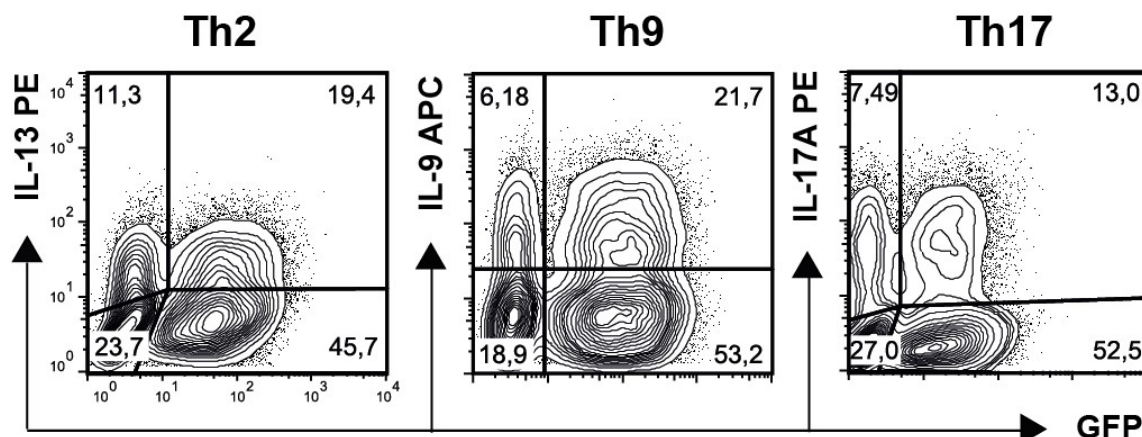


Abbildung 21. FACS-Analyse der Wirkung der Mutante d2-420 auf die WT Th-Zelldifferenzierungen.

irf4^{+/-} CD4⁺-Zellen wurden mit der Mutante d2-420 transduziert und unter Th2-, Th9 und Th17-Bedingungen kultiviert. Nach einer 4-stündigen Restimulation mit PMA, Ionomycin und Brefeldin A wurde die jeweilige intrazelluläre Zytokinfärbung durchgeführt und die Zytokinproduktion zwischen den GFP⁺- und GFP⁻-Zellfraktionen verglichen.

Wie die Abb. 21 zeigt, hat die Mutante d2-420 keinen inhibitorischen Effekt auf die Th2- sowie Th9- und Th17- Zelldifferenzierungen. Die Anteile der IL-13-, IL-9- und IL-17A- produzierenden Zellen innerhalb der GFP⁺ und GFP⁻- Zellfraktionen betrugen jeweils 32,29% : 29,8%, 24,64% : 28,97% und 21,72% : 19,85%, Damit konnte

bewiesen werden, dass die autoinhibitorische Domäne nur in Zusammenhang mit der IRF4-Hauptstruktur ihre inhibitorische Wirkung gegen die Th/c - Zelldifferenzierung entfaltet, während die Domäne für sich allein weder inhibitorisch noch konkurrierend gegen das endogen vorhandene IRF4 wirkt.

4.3.2 Analyse der Mutanten P411-412 und P411-413

Wie in den oberen Experimenten erwähnt ist, richtete die Deletion weiterer 10 aa vor der autoinhibitorischen Domäne die Differenzierungen aller untersuchten Th/c-Zellsubtypen zugrunde. Mit anderen Worten, sind diese 10 aa für die IRF4-abhängigen Th/c-Zelldifferenzierungen wichtig.

In diesem Zusammenhang versuchte ich, diese 10 aa durch die Deletion/den Austausch einzelner aa in diesem Bereich zu modifizieren, um die zentral wichtigen aa für die Th/c-Zelldifferenzierungen zu finden. In der Strukturanalyse von IRF4 zeigte sich, dass sich eine α -Helix-Struktur in der Nähe der aa-Positionen 411-413 des IRF4-Proteins befindet (Brass et al., 1996; Remesh et al., 2015). Molekular betrachtet, besitzt die α -Helix-Struktur starke, stabilisierende Wasserstoffbrückenbindungen, die jeweils zwischen der ersten und vierten Peptidbindung ausgebildet werden. Dies bedingt in 3.6-Aminosäure-Einheiten eine Windung.

Bestimmte Aminosäuren stören die Ausbildung der α -Helix-Struktur, wobei vor allem das heterozyklische Prolin zu erwähnen ist, dessen Präsenz besonders zu Abweichungen von der regelmäßigen Struktur führt (Piela et al., 1987). Von dieser Recherche aus wurde der Schwerpunkt auf den Austausch einzelner aa zu Prolinen in diesem Bereich gelegt. Die Prolin-Austauschmutanten R411P, P411-412 und P411-413 wurden konstruiert, in das übliche Vektorsystem kloniert und in *irf4*^{-/-} Th/c-Zellen getestet. Durch den einzelnen Austausch gegen Prolin von aa 411 (R411P) wurde die Th17-Differenzierung beeinflusst, aber dieser Effekt war hochvariabel in verschiedenen Experimenten und soll deshalb nicht näher dargestellt werden. Auf die anderen beiden Mutanten soll in der Folge ausführlich eingegangen werden.

4.3.2.1 Die Mutante P411-412 führt zu reduzierter Th9- und Th17-Differenzierung

Wie in den oberen Experimenten mit den Mutanten d421-450 und d411-450 wurden auch für P411-412 und P411-413 die Zytokinproduktion, sowie die Expression des Chemokinrezeptors CCR6 als Differenzierungsmarker zur Untersuchung verwendet.

4.3.2.1.1 Die Mutante P411-412 führt zu reduzierter Zytokinproduktion in Th9- und Th17- Zellen

Die Prolinmutanten wurden in naiven Th-Zellen unter den verschiedenen Th-Zelldifferenzierungsbedingungen exprimiert und die Zytokinproduktion wurde anhand von FACS bzw. ELISA gemessen. Die FACS-Analyse und ELISA-Ergebnisse sind in Abb. 22 bis 24 dargestellt.

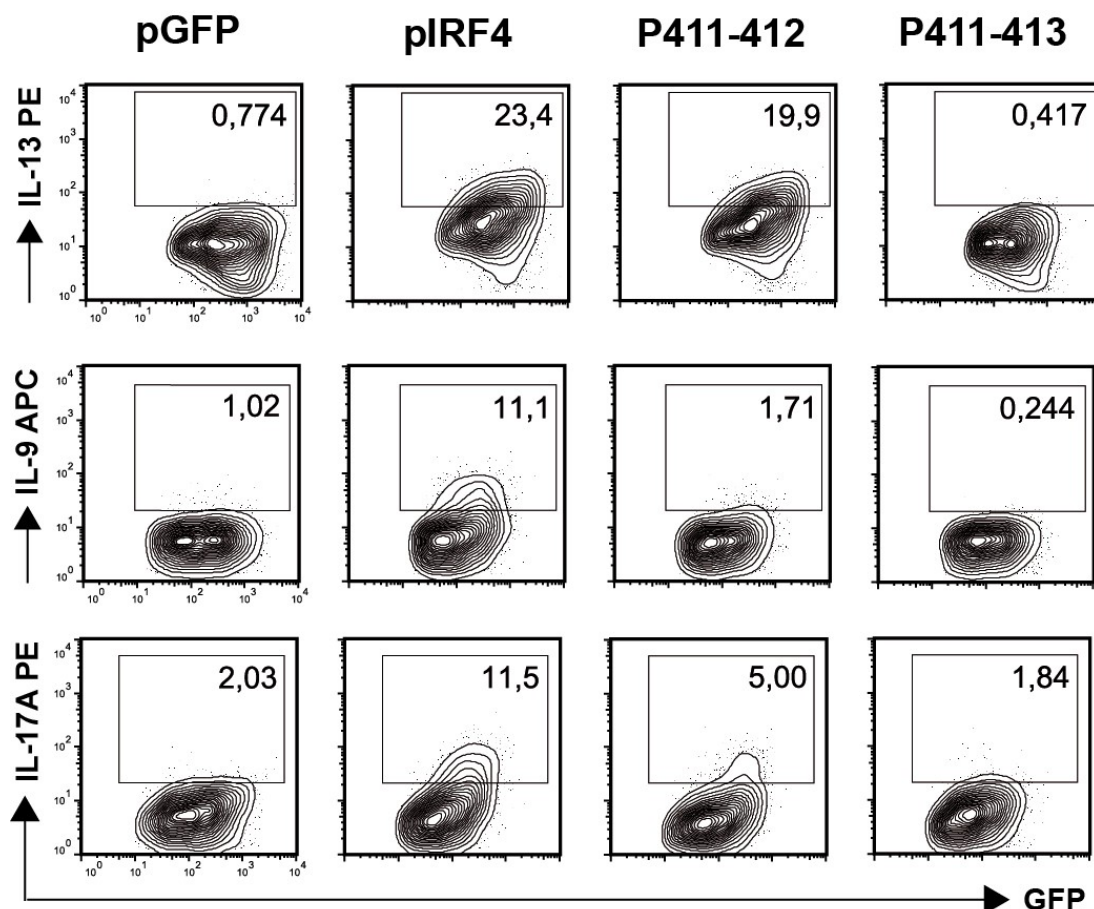


Abbildung 22. FACS-Analyse der Zytokinproduktion nach Transduktion der IRF4-Mutanten P411-412 und P411-413 in Th-Zellen.

Die mit den Mutanten P411-412 und P411-413 sowie mit pGFP und pIRF4 transduzierten naiven *irf4*^{-/-} Th-Zellen wurden mit derselben Methode wie bei Abb. 12 behandelt und durchflusszytometrisch analysiert. Die Zellen wurden auf die Expression von GFP untersucht, nur die GFP⁺-Zellpopulationen wurde gated, hier dargestellt und deren Zytokinproduktion gemessen. Die Zahlenwerte entsprechen dem prozentualen Anteil der jeweiligen eingegrenzten Zellpopulation. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment. Die Gesamtauswertung ist in Abb. 23 dargestellt.

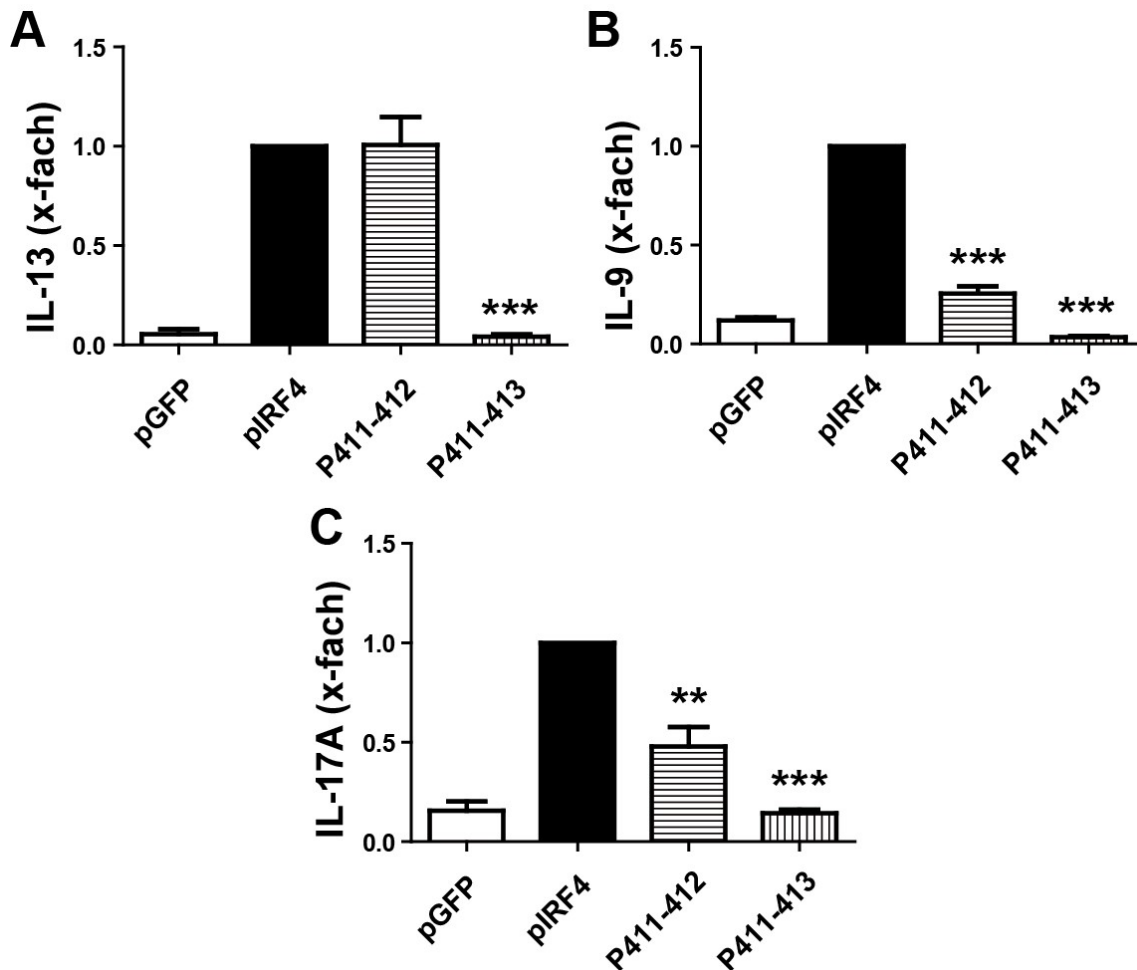


Abbildung 23. Übersicht der Effekte der IRF4-Mutanten P411-412 und P411-413 auf die Zytokinproduktion von Th-Zellen.

(A-C): Die Analyse wurde durchgeführt, wie in Abbildung 13 beschrieben. (A): Wirkung der Mutanten auf die IL-13-Produktion unter Th2-Bedingungen, (B): Wirkung auf die IL-9-Produktion unter Th9-Bedingungen, (C): Wirkung auf die IL-17A-Produktion unter Th17-Bedingungen. Die Prozentwerte für die Mutanten wurden jeweils durch den für die pIRF4-Probe geteilt und als Faktor kalkuliert. Der Wert für pIRF4 wurde im jeweiligen Experiment auf 1 gesetzt. Das Experiment wurde mindestens dreimal wiederholt mit ähnlichem Ergebnis. Die

4 Ergebnisse

jeweils erzielten Faktoren wurden hier als Mittelwert \pm SD zusammengefasst. **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$ im Vergleich zu pIRF4.

Die Abb. 22 und 23 zeigen, dass die Mutante P411-412 die IL-9-Produktion von Th9-Zellen und die IL-17A-Produktion von Th17-Zellen signifikant weniger induziert und dass P411-413 in allen Th-Zellsubtypen die Zytokinproduktion verhindert.

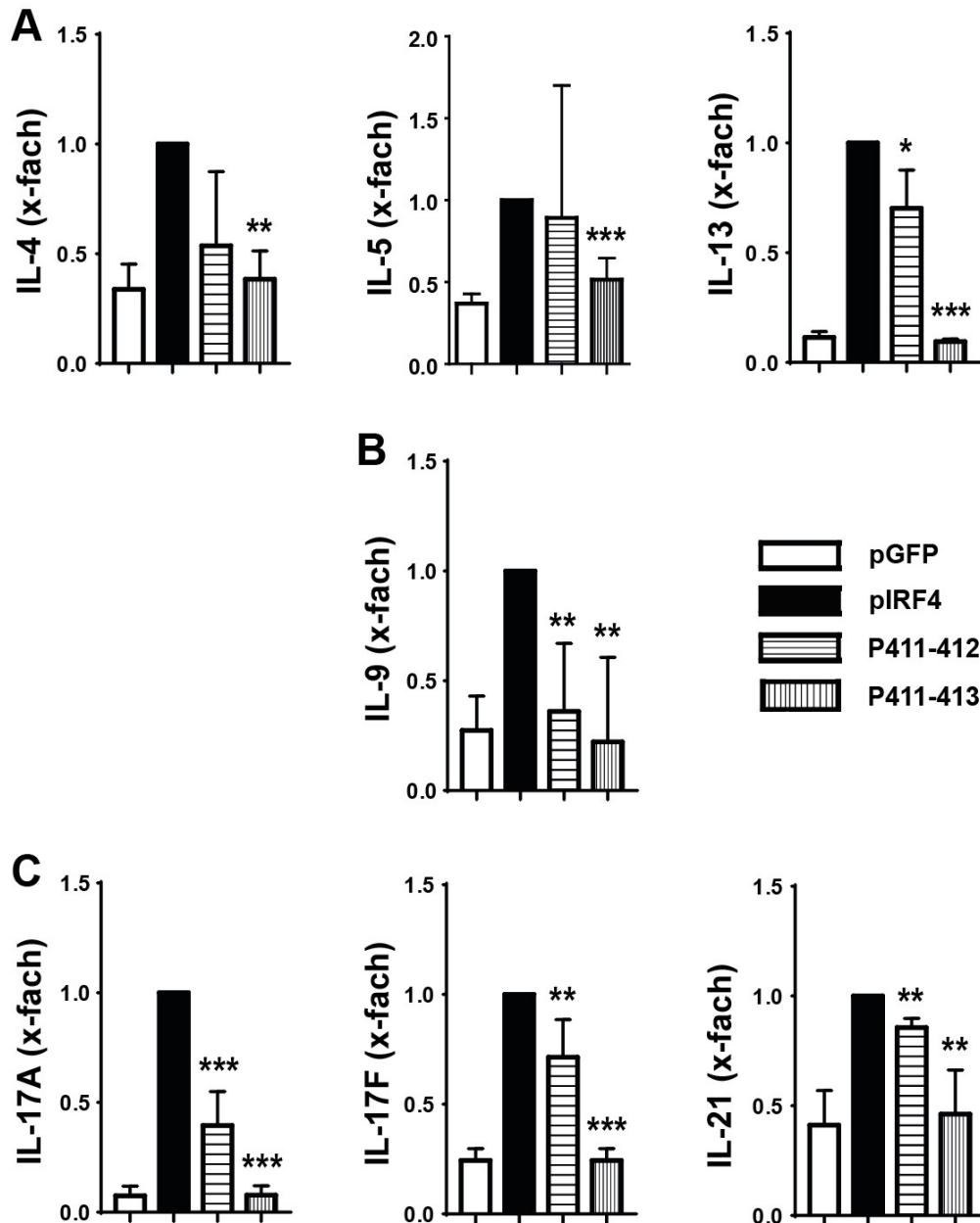


Abbildung 24. Zytokinproduktionen (ELISA) nach Transduktion mit pGFP, pIRF4 und den Mutanten P411-412 und P411-413 in verschiedenen Th-Zellsubpopulationen.

(A-C): Nach Transduktion von *irf4*^{-/-} - Th-Zellen mit den erwähnten Mutanten und Kultivierung unter den entsprechenden Bedingungen wurden gleiche Mengen an Zellen mit dem PMA und

Ionomycin enthaltenden frischen RPMI-Medium für 4 Std. restimuliert. Die Messungen erfolgten mit den Überständen. Die Messwerte der pIRF4-Proben wurden auf eins gesetzt und die Werte der Mutanten drauf bezogen. Dadurch wurden die Effekte der Mutanten auf die Zytokinproduktion als Faktor kalkuliert. (A): Th2-Zytokinproduktion (IL-4, IL-5, IL-13) unter Th2-Bedingungen. (B): IL-9-Produktion unter Th9-Bedingungen. (C): Th17-Zytokinproduktion (IL-17A, IL-17F, IL-21) unter Th17-Bedingungen. Das Experiment wurde dreimal wiederholt mit ähnlichem Ergebnis. Die jeweils erzielten Faktoren wurden hier als Mittelwert \pm SD zusammengefasst. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$ im Vergleich zu pIRF4.

Um zu überprüfen, ob diese Effekte sich auch bei anderen linienspezifischen Zytokinen finden, wurden wie für die anderen Mutanten oben auch hier die bekannten Zytokinprofile von Th2-, Th9- und Th17-Zellen per ELISA bestimmt. Die hier gemessenen Zytokinproduktionen wiesen die gleiche Tendenz auf, wobei Th2-Zellzytokine hier im Gegensatz zur FACS Analyse eine leichte Reduktion im Vergleich zur IRF4-Probe aufwiesen (Abb.24). Die Mutante P411-413 ergab wiederum den kompletten Rückgang sämtlicher Zytokinproduktion (Abb.24).

4.3.2.1.2 Die Mutante P411-412 führt zu reduzierter CCR6-Expression in Th17-Zellen

Als Nächstes wurde der Effekt der Mutanten P411-412 und P411-413 auf die Expression von CCR6 als linienspezifischem Oberflächenmarker von Th17-Zellen bestimmt. Wie in der Abb.25 zu sehen ist, war die Expression von CCR6 auf Th17-Zellen bei beiden Prolinmutanten stark reduziert, wobei bei der Mutante P411-413 das Niveau von GFP erreicht wurde ($p < 0,001$).

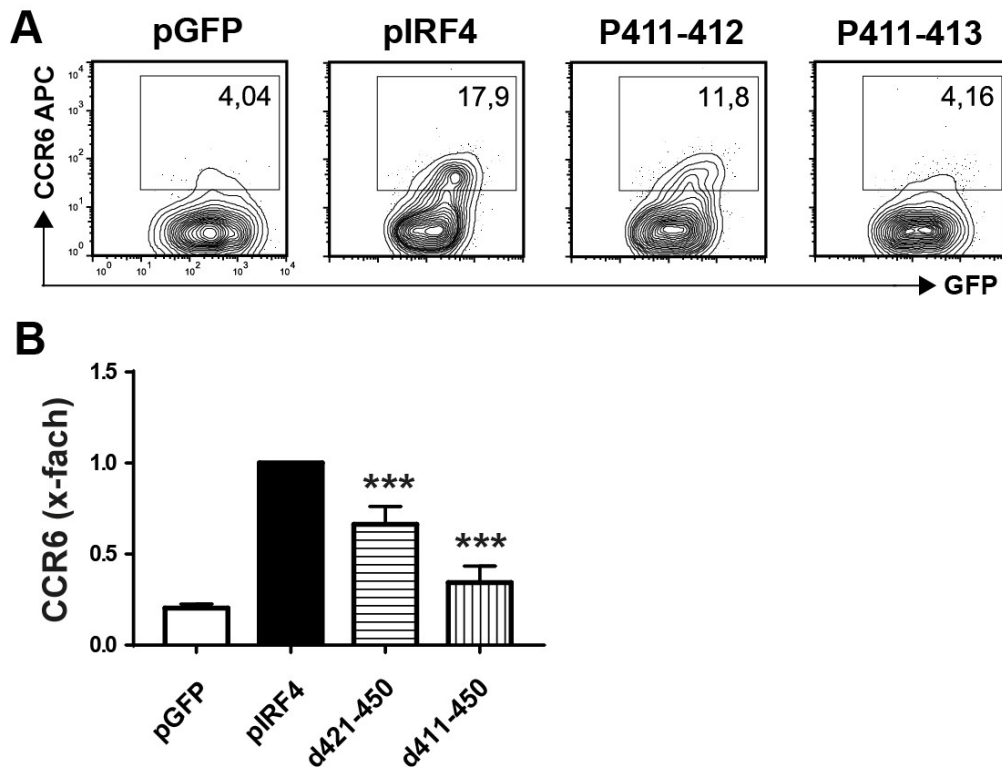


Abbildung 25. Durch pIRF4 und dessen Mutanten P411-412 und P411-413 vermittelte CCR6-Expression in Th17-Zellsubpopulationen.

(A, B): Die P411-412 sowie pGFP, pIRF4 und P411-413 transduzierten naiven *irf4*^{-/-}-T-Zellen wurden jeweils in Th17 -Differenzierungsbedingungen kultiviert. Diese Zellen wurden durchflusszytometrisch auf die Expression von GFP untersucht, nur die GFP⁺-Zellpopulationen wurde gated, hier dargestellt und, auf das Vorhandensein des Oberflächenmarkers CCR6 hin analysiert. (A): FACS-Daten der CCR6-Expression. Die Daten zeigen einen repräsentativen Versuch. Die Zahlenwerte entsprechen dem prozentualen Anteil der jeweiligen eingegrenzten Zellpopulation. (B): Zusammenfassung der Effekte der IRF4-Mutanten P411-412 und P411-413 auf die CCR6-Expression in Th17-Zellen. Die Effekte der Mutanten auf die CCR6-Expression wurden analog zu Abb. 13 analysiert. Aufgetragen ist der Faktor der CCR6⁺ Zellen (%), bezogen auf den Wert für pIRF4. Das Experiment wurde fünfmal wiederholt mit ähnlichem Ergebnis. Gezeigt sind die Mittelwerte der Faktoren aus den Einzelexperimenten \pm SD. ***: $p < 0,001$ bezogen auf pIRF4.

4.3.2.2 Die Mutante P411-412 vermittelt eine reduzierte Tc - Differenzierung

Abschließend wurden die Effekte der Prolinmutanten auf die Tc-Zelldifferenzierung analysiert. Erneut wurden dabei per FACS nur Tc17 Zellen analysiert, da weder IL-9 noch IL-13 anfärbbar waren (Daten nicht gezeigt). Wie in den Abb.26 und 27 zu sehen

ist, führten die Mutanten P411-412 und P411-413 jeweils zu reduzierten Zytokinproduktionen in allen Tc-Subtypen, wobei P411-412 bemerkenswerterweise die Tc17- Differenzierung wesentlich stärker beeinflusste als die Tc2 und Tc9- Differenzierung. Dagegen war P411-413 in allen Tc Subtypen inaktiv.

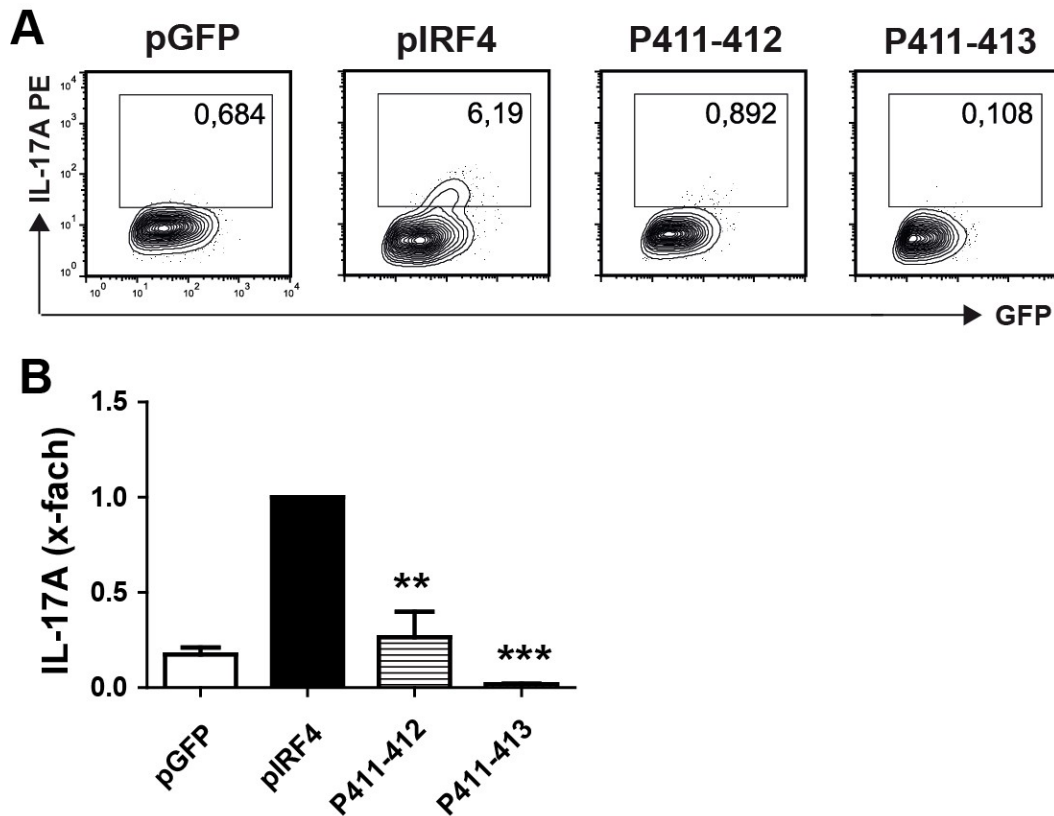


Abbildung 26. FACS-Analyse der IL-17A Produktion von mit den IRF4-Mutanten P411-412 und P411-413 transduzierten *irf4*^{-/-} Tc-Zellen.

(A, B): Die P411-412 sowie pGFP, pIRF4 und P411-413 transduzierten naiven Tc-Zellen wurden ähnlich wie die Th17-Zellen (siehe Abb.12; allerdings zusätzlich mit anti-CD28) behandelt und analysiert. (A): FACS-Daten der IL-17A-Färbung. Die Zellen wurden durchflusszytometrisch auf die Expression von GFP untersucht, nur die GFP⁺-Zellpopulationen wurde gated, hier dargestellt und auf das Vorhandensein von IL-17A hin analysiert. Die Daten zeigen einen repräsentativen Versuch. (B): Grafische Zusammenfassung der Effekte der IRF4-Mutanten P411-412 und P411-413 auf die IL-17A-Produktion von Tc17-Zellen. Der prozentuale Anteil der Zytokinproduzierenden Zellen innerhalb der GFP⁺-Population wurde berechnet. Diese Werte für die Mutanten wurden jeweils durch den für die pIRF4- Probe geteilt und als Faktor kalkuliert. Der Wert für pIRF4 wurde im jeweiligen Experiment auf 1 gesetzt. Das Experiment wurde dreimal wiederholt mit ähnlichem Ergebnis. Die jeweils erzielten Faktoren wurden hier als Mittelwert \pm SD zusammengefasst. Die Fehlerbalken entsprechen der SD der Messwerte. **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$ im Vergleich zu pIRF4.

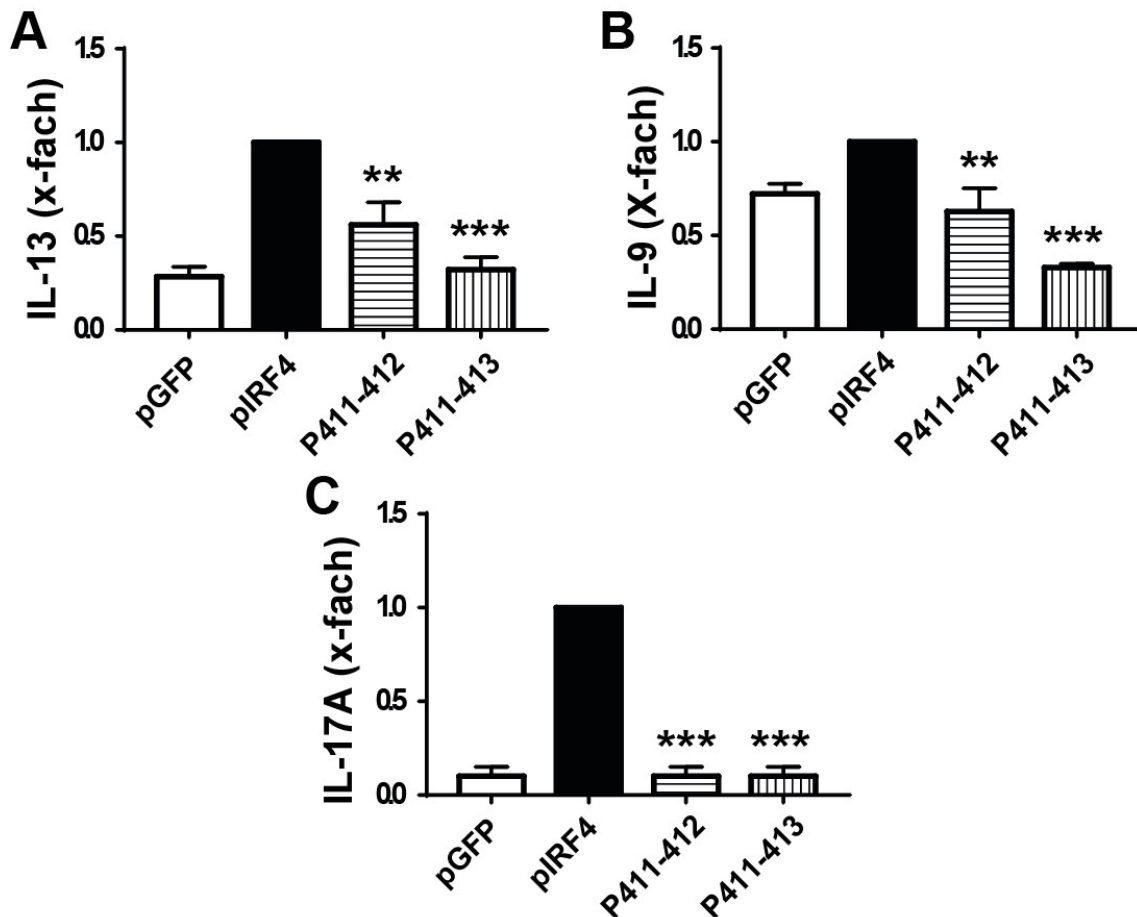


Abbildung 27. Zytokinproduktion (ELISA) nach Transduktion mit pGFP, pIRF4 und den Mutanten P411-412 und P411-413 in verschiedenen Tc-Zellsubpopulationen.

(A-C): Nach der Kultivierung unter den entsprechenden Bedingungen und Transduktion mit den erwähnten Mutanten wurden die Tc-Zellen wie Th-Zellen behandelt und analysiert (siehe Abb. 14, allerdings zusätzlich mit anti-CD28). (A): IL-13-Produktion unter Tc2-Bedingungen. (B): IL-9-Produktion unter Tc9-Bedingungen. (C): IL-17A-Produktion unter Tc17 Bedingungen. Die Messwerte der pIRF4-Proben wurden auf eins gesetzt und die Werte der Mutanten drauf bezogen. Dadurch wurden die Effekte der Mutanten auf die Zytokinproduktion als Faktor kalkuliert. Das Experiment wurde dreimal wiederholt mit ähnlichem Ergebnis. Die jeweils erzielten Faktoren wurden hier als Mittelwert \pm SD zusammengefasst. Die Fehlerbalken entsprechen der SD der Messwerte. **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$ im Vergleich zu pIRF4.

Zusammenfassend führt die Mutante P411-412 zu einer Reduktion der Th und Tc Differenzierung, was zu verminderter Zytokinproduktion und Expression von CCR6 führt. Dabei ist Test-abhängig die Th/c9 und Th/c17 Differenzierung mehr oder weniger betroffen, die Th/c2 Differenzierung dagegen nur eingeschränkt verändert. Die Mutante P411-413 führt dagegen ähnlich wie d411-450 zum Erlöschen der IRF4 Funktion.

4.3.3 Einfluss verschiedener Mutanten im Bereich von aa 411-420 auf die Differenzierung von Th2-/Th9-/Th17- Zellen

Das Experiment mit den Mutanten d421-450 und d411-450 stellte fest, dass die 10 aa an Position 411-420 von IRF4 bei der T-Zelldifferenzierung eine wichtige Rolle spielen. In meiner Arbeit habe ich viele weitere Versuche gemacht, um die wichtigsten aa dieser Positionen näher einzugrenzen. Am Anfang wurde diese 10 aa Stelle halbiert, d.h. eine vordere 5 aa Deletionsmutante und eine hintere 5 aa Deletionsmutante wurden analysiert. Die Mutante d411-415 wies einen negativen Einfluss auf alle getesteten Th-Zelldifferenzierungen auf, während d416-420 keine erkennbaren Abweichungen zeigte. Aufgrund dieses Ergebnisses wurden die Experimente mit weiteren Deletionsmutanten (d411, d412, d413, d414-415) und Alanin- (anstelle der viel eingreifenderen Prolin-) Austauschmutanten (R411A, A412-413S, A411-413S und A414-415S) ergänzt, aber diese zeigten zumeist keine signifikanten Ergebnisse, wobei R411A und A411-413S die IL-9-Produktion beim Th9-Differenzierungsprogramm reduzierten, dabei aber nicht das Ausmaß des Effektes von P411-412 erreichten (Abb.28).

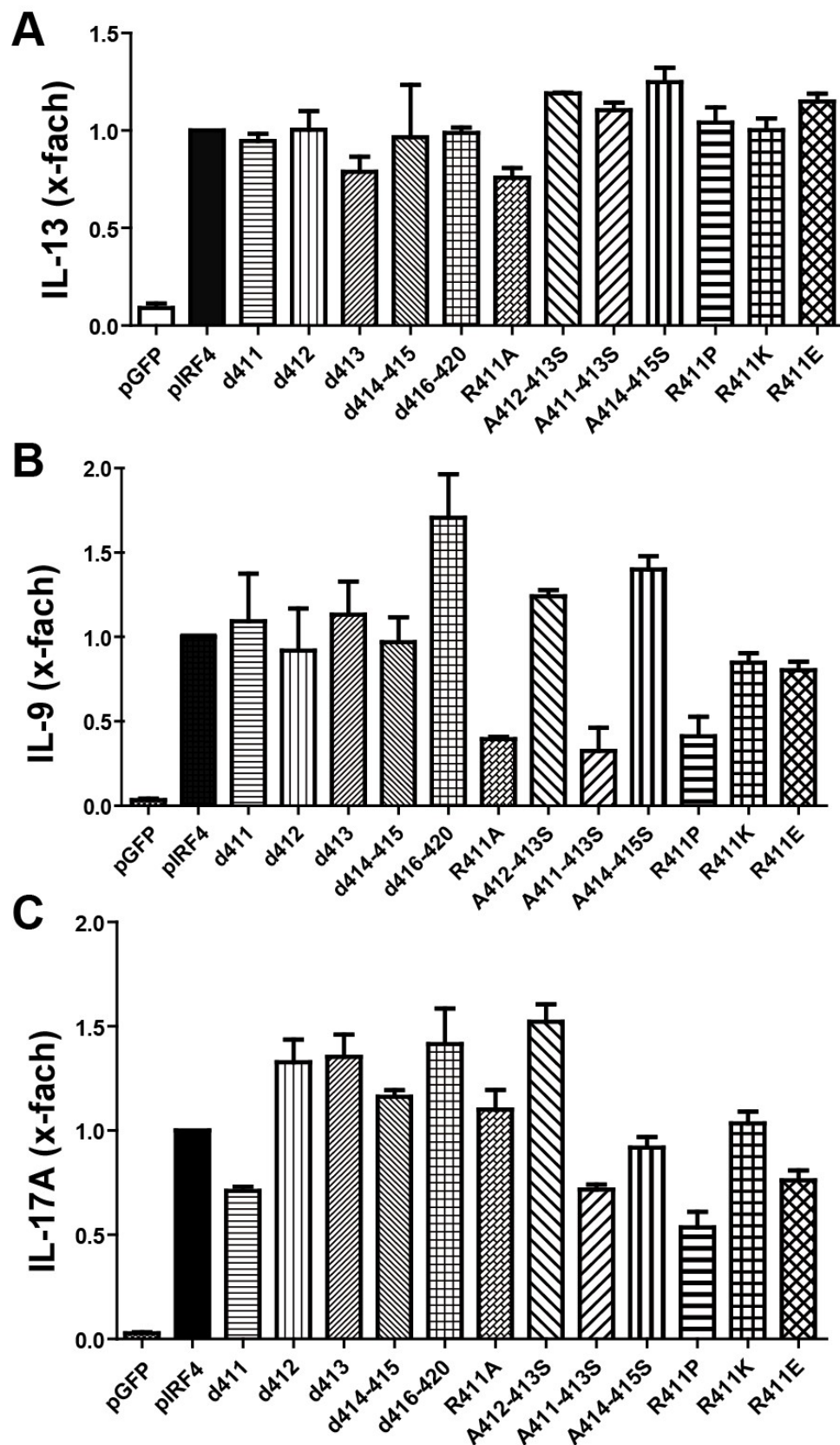


Abbildung 28. Analyse der Effekte verschiedener Mutanten auf die Differenzierung von Th-Zellsubtypen.

4 Ergebnisse

(A-C): Die Mutanten-transduzierten $CD4^{+}$ -T-Zellen wurden in Th2-, Th9- und Th17-Bedingungen kultiviert und die Zytokinproduktion anhand von FACS-Analysen quantifiziert. Die Werte der pIRF4-Proben wurden jeweils auf eins gesetzt und die Ergebnisse anderer Mutanten drauf bezogen. Das Experiment wurde mindestens zweimal wiederholt mit ähnlichem Ergebnis. Die Fehlerbalken entsprechen den Mittelwerten \pm SD der Messwerte.

5 Diskussion

T-Lymphozyten, eine entscheidende Komponente der adaptiven Immunantwort – unterteilen sich zusätzlich zur Trennung nach $CD4^+$ (=“Th“) und $CD8^+$ (=“Tc“) in weitere Subpopulationen, die durch die Freisetzung ihrer linienspezifischen Zytokine definiert werden. Die bis jetzt bekannten T-Zellsubpopulationen sind Th/c1-, Th/c2-, Th/c9-, Th/c17-, Tfh- und i/n-Treg-Zellen, die jeweils die Zytokine IL-2, IFN- γ und TNF- α bei Th/c1-Zellen, IL-4,-5 und -13 bei Th/c2-Zellen, IL-9 bei Th/c9-Zellen, IL-17,-21 und -22 bei Th17-Zellen und IL-10 und TGF- β bei Treg erzeugen. Die Differenzierung der T-Zellsubpopulationen aus gemeinsamen Vorläuferzellen wird begleitet durch die Regulation mehrerer linienspezifischer Transkriptionsfaktoren, von denen T-bet in Th1- (Szabo et al., 2000), GATA-3 in Th2- (Zheng and Flavell, 1997), PU.1 in Th9- (Chang et al., 2010), ROR γ t in Th17- (Ivanov et al., 2006) und FoxP3 in Treg - (Fontenot et al., 2003) Zellen exprimiert werden. Neben diesen Mastertranskriptionsfaktoren gibt es diejenigen, die für die Entwicklung, Differenzierung und Funktion von Immunzellen in breiterem Ausmass essentiell sind. IRF4 ist ein beispielhafter Transkriptionsfaktor, der für die Entwicklungen und Wirkungen mehrerer Immunzellarten von entscheidender Bedeutung ist. Er gilt als essenzieller Transkriptionsfaktor für Th2 (Lohoff et al., 2002), Th9 (Staudt et al., 2010) und Th17 (Brustle et al., 2007)- Zelldifferenzierungen, und die *Irf4*^{-/-} Mäuse sind gegenüber den durch diese Zelllinien vermittelten Autoimmunerkrankungen (EAE) und Asthma resistent (Brustle et al., 2007; Soroosh and Doherty, 2009). Darüber hinaus spielt IRF4 auch für die Differenzierung der Treg und Tfh-Zell-Subpopulationen sowie für die Reifung und die Funktion der B-Zellen eine wichtige Rolle (Brass et al., 1999). Außerdem unterbindet IRF4 die Expression von BCL-6 und hochreguliert Blimp-1, womit die Reaktion des Keimzentrums und die Generation der Plasmazellen kontrolliert werden (Lu, 2008). In dendritischen Zellen reguliert IRF4 den Reifungsvorgang und die MHC-II-Antigenpräsentierung (Vander Lugt et al., 2014). Im Fettgewebe kontrolliert IRF4 zusammen mit BATF und IL-33 die Entwicklung und Aufrechterhaltung der Treg-Zellen (Vasanthakumar et al., 2015). Seit Kurzem hat man auch in nicht hämatopoietischen Zellen Funktionen von IRF4 gefunden. So verstärkt es die Fettspeicherung in Fettzellen (Eguchi et al., 2011) und ein Polymorphismus in IRF4 steht mit der Pigmentation (Praetorius et al., 2013) und Haarfarbe (Adhikari et al., 2016) in

Verbindung. Die Rolle von IRF4 in Tumor sind umstritten, da IRF4 in MM (Natkunam et al., 2001), LPL (Roberts et al., 2013), DLBCL (Tsuboi et al., 2000) und CLL (Ito et al., 2002) als Onkogen und in B-ALL (Acquaviva et al., 2008) und CML (Ortmann et al., 2005; Schmidt et al., 2000) supprimierend wirkt.

Diese Erläuterungen belegen für IRF4 eine unglaublich breite Palette verschiedenster Funktionen. Für die Kontrolle der jeweils richtigen Funktion ist die Wechselwirkung von IRF4 mit anderen Transkriptionsfaktoren erforderlich, da IRF4 selber schwach an die Promotor-/Enhancer-region des Zielgens bindet (Remesh et al., 2015). Die bis jetzt bekannten Partnertranskriptionsfaktoren sind PU.1 (Brass et al., 1999; Escalante et al., 2002b), BATF-Jun (Glasmacher et al., 2012; Li et al., 2012), NFAT (Rengarajan et al., 2002), STAT6 (Gupta et al., 1999), SMAD (Tamiya et al., 2013), ROR γ t (Ouyang et al., 2011) und FKBP32 (Mamane et al., 2000).

Zur Vermittlung dieser unterschiedlichen Interaktionen beinhaltet die IRF4 Struktur verschiedene Domänen, wobei die N-terminale DBD-Domäne für die Bindung an DNA verantwortlich ist, während die C-terminale RD-Domäne sich für die Wechselwirkung mit anderen Partnertranskriptionsfaktoren spezialisiert hat. Frühere Struktur-Funktionsanalysen von IRF4 belegten unmittelbar, dass die Interaktion von IRF4 mit den verschiedenen Partnertranskriptionsfaktoren und die daraus resultierende Effektfunktion nicht durch die gleiche Stelle innerhalb der RD vermittelt wurden, sondern dass jeweils unterschiedliche Bereiche dafür zuständig waren. Brass et al. und Rengarajan et al. haben beschrieben, dass aa 411-419 von IRF4 für die Interaktion mit PU.1 und NFATc2 wichtig war (Brass et al., 1999; Rengarajan et al., 2002), während für die Wechselwirkung mit FKBP32 die aa 150-237 erforderlich waren (Mamane et al., 2000). Jo publizierte, dass aa 201-380, aber nicht die DBD für die Tumorsuppression in CML und B-ALL essentiell war, indem sie die BCR/ABL-Transformation in myeloiden Zellen verhindern (Jo and Ren, 2012). Sciammas et al. bestätigten, dass die DBD unabhängig von der IRF4-PU.1 Interaktion für die Ig-Induktion und den Isotyp-Klassenwechsel bei B-Zellen erforderlich war, da Mutationen in der DBD-Stelle (R98A und C99A) diese Funktionen blockierten (Sciammas et al., 2006).

In früheren Publikationen wurde beschrieben, dass IRF4 in der C-terminalen Region eine autoinhibitorische Domäne besitzt, welche physisch mit der DBD interagiert und das IRF4-Protein so in einem inhibierten Zustand hält (Brass et al., 1996; Remesh et al., 2015). Bereits 1996 hat Brass et al. das hypothetische Interaktionsmodell zwischen

IRF4 und PU.1 vorgeschlagen, in dem (1) die C-terminale autoinhibitorische Domäne von IRF4 durch die Interaktion mit der DBD-Domäne inhibitorisch wirkt und (2) die PEST-Domäne in PU.1 in einer Wechselwirkung mit der autoinhibitorischen Domäne von IRF4 interagiert, und dadurch die inhibitorische Wirkung aufhebt (Brass et al., 1996). Diese Theorie wurde in der Strukturanalyse bewiesen, aber es gab bisher keinen Beleg davon für die IRF4 Funktion in lebenden Zellen.

Die Tatsache, dass IRF4 die Differenzierungen von Th/c2-, Th/c9- und Th/c17- Zellen steuert, weist darauf hin, dass die Deletion der autoinhibitorischen Domäne zur Verbesserung dieser Th/c-Zelldifferenzierungen führen könnte. In meiner Arbeit konnte tatsächlich erstmals gezeigt werden, dass die aus 30 aa bestehende C-terminale autoinhibitorische Domäne die Runterregulierung der Th/c17- und Th/c2-Zelldifferenzierungen bewirkt.

Um den Effekt der autoinhibitorischen Domäne auf die Th/c-Zelldifferenzierungen zu testen, wurde die Mutante (d421-450) kloniert und mittels retroviralem Transduktionssystem konnte es erzielt werden, diese Mutante in Th/c-Zellen zu überexprimieren. Hierfür wurde die ortsspezifische Mutagenese (side-directed mutagenesis) als Klonierungsstrategie verwendet, die nur durch den Einsatz geänderter Primerpaare und ohne Restriktionsenzyme und Ligasen funktioniert. Bereits im Jahr 2000 publizierten Makarova et al., dass durch diese Mutagenese Punktmutationen mit einer Effizienz von 66% und Deletionen von bis zu 3Kb mit 60% Effizienz generiert werden konnten (Makarova et al., 2000).

Im Gegenwart von Antigen-, kostimulatorischen- und Zytokin- Signalen fangen die T-Zellen an sich zu differenzieren, wobei wie erwähnt das Zytokininmilieu die Differenzierungsrichtung entscheidet. Obwohl diese Richtung der sich differenzierenden T-Zellen nach dem Signalkontakt vorgebahnt ist, nehmen die Zellen eine gewisse Zeit in Anspruch, bis sie ihr vollständiges Zytokinprofil aufweisen, da das genetische Imprinting, etwa durch Demethylierung der Gene für die Mastertranskriptionsfaktoren, zeitraubend ist. Die Menge, das Muster und der Zeitverlauf der Zytokinproduktion in den differenzierenden T-Zellen sind von Subtypspezifisch unterschiedlich, so die präzise Beurteilung der Effekte von Mutanten eine genaue Kenntnis der jeweiligen Kinetik der Zytokinproduktion voraussetzt. Um dies zu erreichen, wurden die *irf4*^{+/-}CD4⁺ T-Zellen in unterschiedlichen T-

Zelldifferenzierungsbedingungen kultiviert und die Kinetik der Differenzierungen täglich betrachtet. Die Produktion von IL-4 und IL-13 in Th2-Zellen stieg ständig bis zum Tag 6, wobei der Spiegel von IL-13 an allen gemessenen Tagen höher war als der von IL-4. Die IL-9-Produktion in Th9-Zellen erreichte am Tag 2 ihr höchstes Niveau, fiel ab Tag 3 und war am Tag 6 kaum mehr zu erfassen. Die Kinetik der IL-17A-Produktion zeigte eine fortlaufende Steigung bis zum Tag 3 und blieb danach erhalten. Aufgrund dieser Analyse wurde festgelegt, IL-13- und IL-17A-Messungen am Tag 3 und die IL-9 Messung am Tag 2 durchzuführen, da an diesen Zeitpunkten sowohl die jeweiligen Messwerte, als auch die Zelllebensfähigkeit hoch waren. Die *in vitro* wachsenden Zellen starben nämlich zunehmend, wenn sie länger in Kultur waren (Daten wurden nicht gezeigt).

Die Abbildungen 12, 13, 15, 18 und 19 zeigen, dass die Mutante d421-450 Th/c2- (IL-4, IL-5 und IL-13) und Th/c17- (IL-17A, IL-17F und IL-21) Zytokinproduktionen hochregulierte, wobei das Ausmaß des Effektes bei Th/c17-Zytokinen höher war als das bei Th/c2-Zytokinen. Dagegen war der Einfluss auf die Th9-Zytokinproduktion (IL-9) nur gering. Interessanterweise war zu sehen, dass unter Th2 Differenzierungsbedingungen der IL-5- Spiegel in *irf4*^{-/-}-T-Zellen bereits nach Transduktion mit dem Leervektor pGFP relativ hoch war. Es stellte sich daher die Frage, ob IL-5 bedingungsunabhängig in *irf4*^{-/-}-Zellen hochexprimiert wurde. Wie in der Abb. 14 zu sehen ist, war aber die IL-5-Produktion in anderen Th9- und Th17-Bedingungen kaum zu detektieren. Das deutet darauf hin, dass die IL-5-Produktion in *irf4*^{-/-}-Th-Zellen neben IRF4 auch noch durch einen anderen Faktor reguliert wird, der seinerseits durch IL-4 unter Th2-Differenzierungsbedingungen aktiviert wird. Zukünftige Untersuchungen der IL-5-Produktion in WT- ver. KO-Th-Zellsubtypen wird unsere Idee aufgreifen.

Neben den Zytokinen, die die T-Zellen linienspezifisch produzieren, gibt es andere Merkmale, die der Differenzierungsphase entsprechen. Dazu gehören die Chemokinrezeptoren und Transkriptionsfaktoren. CCR6 ist ein charakteristischer Chemokinrezeptor von Th17-Zellen und unterstützt die Migration dieser Zellen (Wang et al., 2009). Die Expression von CCR6 in Th17-Bedingungen bewies, dass auch dieser Chemokinrezeptor über den IRF4-Signalweg reguliert wird und dass d421-450 auch dessen Expression hochreguliert. Dies bestätigte wiederum die hemmende Wirkung der autoinhibitorischen Domäne von IRF4 auf die Th17-Zelldifferenzierung. Frühere Studien zeigten, dass Th2- und Th9- Zellen auf der Oberflächen CCR4 exprimieren,

aber eine CCR4-Expression war auf den IRF4-transduzierten Th2- und Th9- Zellen nicht zu detektieren (Daten nicht gezeigt).

Wie erwähnt, werden während der Th-Zelldifferenzierung die linienspezifischen Master-Transkriptionsfaktoren exprimiert und dies führt zur Transkription der linienspezifischen Zytokine und dadurch der Differenzierungen der Th-Zellsubpopulationen. Die Ergebnisse, dass die Mutante d421-450 die Th2- und Th17-Differenzierungen positiv beeinflusste, bewirkte die Frage, ob diese Erhöhungen auf die hochregulierten Master-Transkriptionsfaktoren zurückzuführen waren. Um diese Frage zu erklären, wurde die Expression von ROR γ t bei Th17-Zellen analysiert. In diesem Experiment wurde bewiesen, dass IRF4-Überexpression in *irf4*^{-/-}Th17-Zellen die ROR γ t-Expression reguliert. Auch hier führte die Mutante d421-450 zu einer weiteren Erhöhung. Unser Ergebnis stimmt mit dem Befund anderer Studien überein, dass die ROR γ t-Expression in *irf4*^{-/-}Th17-Zellen sehr niedrig war und ROR γ t über den IRF4-Signalweg reguliert wird (Huber et al., 2008). Die Untersuchung der ROR γ t-Expression bewies auch in diesem Fall, dass schon Leervektor-transduzierte Th17-Zellen im Vergleich zu anderen Th-Zellsubtypen eine erhöhte ROR γ t-Expression zeigten. Dies wies darauf hin, dass so wie IL-5 auch ROR γ t abhängig von den Differenzierungsbedingungen, aber zum Teil unabhängig vom IRF4-Signalweg kontrolliert werden kann.

Die oben erwähnten, früheren Arbeiten messen den 10 aa vor der autoinhibitorischen Domäne eine besondere Rolle bei der Funktion von IRF4 zu, etwa bei der Interaktion mit PU.1 und NFATc2 (Brass et al., 1999; Rengarajan et al., 2002). Um zu testen, ob dies auch für die gesteigerte Funktion in Abwesenheit der autoinhibitorischen Domäne gilt, wurde die Mutante d411-450 generiert und mit d421-450 mitgetestet. Ein etwaiger Unterschied der Effekte dieser Mutanten würde der Rolle dieser Region entsprechen. Es ist wichtig, festzuhalten, dass in allen untersuchten Differenzierungsmarkern die Mutante d411-450 keinerlei IRF4 Funktionen mehr aufwies und negative Resultate wie der Leervektor zeigte, d.h. die aa 411-420 von IRF4 sind für die Regulation der T-Zelldifferenzierungen auch in Abwesenheit der autoinhibitorischen Domäne entscheidend.

Um auszuschließen, dass die erhöhte Differenzierung von Th/c-Zellen in d421-450 transduzierten Zellen auf eine verstärkte Proteinexpression in den Zellen zurückzuführen ist, wurde die Proteinexpression in HEK-Zellen mittels Western-Blot analysiert. Auf Ebene der Proteinmenge war in diesen Zellen aber kein deutlicher

Unterschied zwischen IRF4 und der Mutante d421-450 zu sehen. Weiterhin wurde getestet, ob die autoinhibitorische Domäne alleine eine hemmende Wirkung auf Th/c-Zelldifferenzierungen entwickeln kann. Um zu wissen, ob die ektopisch exprimierte autoinhibitorische Domäne die Wirkung von endogenem IRF4 neutralisiert, wurde die klonierte autoinhibitorische Domäne (d2-420) im Th-Zelldifferenzierungssystem in *irf4*^{+/-}Th-Zellen transduziert, welche das Gen für IRF4 tragen. Die Präsenz der autoinhibitorischen Domäne zeigte aber keine hemmende Wirkung auf alle getesteten Th-Zelldifferenzierungen. Dies zeigt, dass die autoinhibitorische Domäne nur in kovalenter Verbindung mit dem IRF4-Molekül ihre Funktion wahrnimmt.

Im zweiten Teil dieser Studie wurde die Funktion von aa 411-420 noch tiefergehend analysiert. Hierbei wurde bewiesen, dass der Austausch von aa 411 und 412 durch Prolin zu einer stark eingeschränkten Funktion bei der Differenzierung von Th/c9- und Th/c17- Zellen führt, während der Austausch von aa 411-413 durch Prolin sämtlichen Th/c-Zelldifferenzierungen verhindert. Um die exakte Aminosäure zu finden, welche die Th/c-Zelldifferenzierung in diesem Bereich so stark beeinflusst, wurden weitere Modifikationen an dieser Stelle durchgeführt. Die getesteten Deletionsmutanten (d411, d412, d413, d414-415 und d416-420) erzielten keine signifikanten Änderungen in den Th-Zelldifferenzierungen (Abb. 28). Vermutlich wurde hier die Rolle der deletierten aa jeweils von der nachfolgenden aa kompensiert, so dass kein Effekt zu detektieren war. Im nächsten Schritt wurden die jeweiligen aa durch Alanin ersetzt, welches für die Mutagenese üblicherweise verwendet wird, da es elektrisch neutral ist und daher weniger eingreifend als Prolin. Die Mutanten R411A und A411-413 zeigten eine Senkung der IL-9-Produktion von Th9-Zellen (ungefähr um 50%), aber ein Effekt auf die IL13- und IL-17-Produktion in Th2- und Th17-Zellen war nicht erkennbar (Abb. 28). Bereits 1996 beschrieben Brass et al. eine mutmaßliche α -Helix-Struktur innerhalb der 399-ten bis 413-ten aa in IRF4 (Brass et al., 1996) und Rengarajan et al. erwähnten, dass diese α -Helix-Struktur für die Interaktion mit NFATc2 essentiell ist (Rengarajan et al., 2002). 2015 bestätigten Remesh et al., dass IRF4 zwischen den aa Positionen 408 und 417 tatsächlich eine α -Helix-Struktur besitzt (Remesh et al., 2015). Ist das die neueste kristallanalyse? Wir gehen davon aus, dass die Modifikation dieser α -Helix-Struktur zu entscheidenden Veränderungen der IRF4 Funktion und damit Th-Zelldifferenzierung führen kann und der Austausch gegen Prolin an diesen aa-Positionen, die Bildung der α -Helix-Struktur verhindert. Prolin ist die einzige

Aminosäure, deren Peptidbindung kein Wasserstoffatom aufweist. Folglich kann es sich nicht an der Bindung von Wasserstoffbrückenbindungen beteiligen, die die Grundlage der α -Helix-Struktur sind. Bemerkenswert war, dass die Mutante P411-412 sich besonders stark auf die Th/c9- und Th/c17-Zelldifferenzierungen auswirkte, während die Th/2-Differenzierung davon kaum betroffen war. Auch die CCR6-Expression zeigte bei Mutante P411-412 einen erheblichen Rückgang. Der einzelne Prolinaustausch an der Stelle 411 (R411P) wies nur eine leichte Senkung der Th9-Differenzierung auf (Abb. 28), während Mutante P411-413 den Verlust aller Th/c-Zelldifferenzierungen erzielte. Ob der nur geringe Effekt auf die Th/c2 Differenzierung auf die Existenz eines von der α -Helix unabhängigen anderen Bereichs innerhalb von IRF4 mit besonderer Rolle für die Th/c2 Differenzierung bedeutet, müssen zukünftige Studien klären.

Zusammenfassend konnte im ersten Teil dieser Arbeit nicht nur die Anwesenheit der autoinhibitorischen Domäne, sondern auch ihre Rolle bei der T-Zelldifferenzierung bestätigt werden. Dabei wurde festgestellt, dass die autoinhibitorische Domäne die Th/c17- und Th/c2- Differenzierungen negativ beeinflusst. Im nächsten Teil der Arbeit wurde beobachtet, dass die im Bereich der α -Helix lokalisierten Prolinmutanten P411-412 keinerlei Funktionen bei der Th/c9- und Th/c17-Differenzierung mehr aufweisen. Diese Arbeit ist daher die erste Untersuchung der Funktion von IRF4-Mutanten auf die T-Zelldifferenzierung.

6 Literaturverzeichnis

Buchliteratur:

Kenneth M. Murphy, Paul Travers, Mark Walport (2009). Janeway Immunologie. Springer Spektrum Verlag. 7., Auflage

Original-Publikationen und Übersichtsartikel:

Acquaviva, J., Chen, X.R., and Ren, R.B. (2008). IRF-4 functions as a tumor suppressor in early B-cell development. *Blood* 112, 3798-3806.

Adhikari, K., Fontanil, T., Cal, S., Mendoza-Revilla, J., Fuentes-Guajardo, M., Chacon-Duque, J.C., Al-Saadi, F., Johansson, J.A., Quinto-Sanchez, M., Acuna-Alonzo, V., *et al.* (2016). A genome-wide association scan in admixed Latin Americans identifies loci influencing facial and scalp hair features. *Nat Commun* 7, 10815.

Afkarian, M., Sedy, J.R., Yang, J., Jacobson, N.G., Cereb, N., Yang, S.Y., Murphy, T.L., and Murphy, K.M. (2002). T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4(+) T cells. *Nat Immunol* 3, 549-557.

Amsen, D., Blander, J.M., Lee, G.R., Tanigaki, K., Honjo, T., and Flavell, R.A. (2004). Instruction of distinct CD4 T helper cell fates by different notch ligands on antigen-presenting cells. *Cell* 117, 515-526.

Ansel, K.M., Djuretic, I., Tanasa, B., and Rao, A. (2006). Regulation of Th2 differentiation and Il4 locus accessibility. *Annual review of immunology* 24, 607-656.

Baraldo, S., Faffe, D.S., Moore, P.E., Whitehead, T., McKenna, M., Silverman, E.S., Panettieri, R.A., Jr., and Shore, S.A. (2003). Interleukin-9 influences chemokine release in airway smooth muscle: role of ERK. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 284, L1093-1102.

Bassil, R., Orent, W., Olah, M., Kurdi, A.T., Frangieh, M., Buttrick, T., Khoury, S.J., and Elyaman, W. (2014). BCL6 Controls Th9 Cell Development by Repressing Il9 Transcription. *Journal of immunology* 193, 198-207.

Bell, R.G. (1996). IgE, allergies and helminth parasites: a new perspective on an old conundrum. *Immunol Cell Biol* 74, 337-345.

Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T.B., Oukka, M., Weiner, H.L., and Kuchroo, V.K. (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441, 235-238.

Bettelli, E., Korn, T., Oukka, M., and Kuchroo, V.K. (2008). Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature* 453, 1051-1057.

Bidwell, B.N., Slaney, C.Y., Withana, N.P., Forster, S., Cao, Y., Loi, S., Andrews, D., Mikeska, T., Mangan, N.E., Samarajiwa, S.A., *et al.* (2012). Silencing of Irf7 pathways in breast cancer cells promotes bone metastasis through immune escape. *Nature medicine* 18, 1224-+.

Biswas, P.S., Bhagat, G., and Pernis, A.B. (2010). IRF4 and its regulators: evolving insights into the pathogenesis of inflammatory arthritis? *Immunological reviews* 233, 79-96.

Bollig, N., Brustle, A., Kellner, K., Ackermann, W., Abass, E., Raifer, H., Camara, B., Brendel, C., Giel, G., Bothur, E., *et al.* (2012). Transcription factor IRF4 determines germinal center formation through follicular T-helper cell differentiation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 109, 8664-8669.

Botti, E., Spallone, G., Moretti, F., Marinari, B., Pinetti, V., Galanti, S., De Meo, P.D., De Nicola, F., Ganci, F., Castrignano, T., *et al.* (2011). Developmental factor IRF6 exhibits tumor suppressor activity in squamous cell carcinomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 13710-13715.

Brass, A.L., Kehrli, E., Eisenbeis, C.F., Storb, U., and Singh, H. (1996). Pip, a lymphoid-restricted IRF, contains a regulatory domain that is important for autoinhibition and ternary complex formation with the Ets factor PU.1. *Genes & development* 10, 2335-2347.

Brass, A.L., Zhu, A.Q., and Singh, H. (1999). Assembly requirements of PU.1-Pip (IRF-4) activator complexes: inhibiting function in vivo using fused dimers. *Embo Journal* 18, 977-991.

Brenner, M.B., McLean, J., Dialynas, D.P., Strominger, J.L., Smith, J.A., Owen, F.L., Seidman, J.G., Ip, S., Rosen, F., and Krangel, M.S. (1986). Identification of a putative second T-cell receptor. *Nature* 322, 145-149.

Brustle, A., Heink, S., Huber, M., Rosenplanter, C., Stadelmann, C., Yu, P., Arpaia, E., Mak, T.W., Kamradt, T., and Lohoff, M. (2007). The development of inflammatory T(H)-17 cells requires interferon-regulatory factor 4. *Nat.Immunol.* 8, 958-966.

Carotta, S., Willis, S.N., Hasbold, J., Inouye, M., Pang, S.H., Emslie, D., Light, A., Chopin, M., Shi, W., Wang, H., *et al.* (2014). The transcription factors IRF8 and PU.1 negatively regulate plasma cell differentiation. *J Exp Med* 211, 2169-2181.

Castellanos-Rubio, A., Santin, I., Irastorza, I., Castano, L., Carlos Vitoria, J., and Ramon Bilbao, J. (2009). TH17 (and TH1) signatures of intestinal biopsies of CD patients in response to gliadin. *Autoimmunity* 42, 69-73.

Chang, H.C., Sehra, S., Goswami, R., Yao, W., Yu, Q., Stritesky, G.L., Jabeen, R., McKinley, C., Ahyi, A.N., Han, L., *et al.* (2010). The transcription factor PU.1 is required for the development of IL-9-producing T cells and allergic inflammation. *Nat.Immunol.* 11, 527-534.

Cosmi, L., Liotta, F., Maggi, E., Romagnani, S., and Annunziato, F. (2011). Th17 cells: new players in asthma pathogenesis. *Allergy* 66, 989-998.

Cote-Sierra, J., Foucras, G., Guo, L., Chiodetti, L., Young, H.A., Hu-Li, J., Zhu, J., and Paul, W.E. (2004). Interleukin 2 plays a central role in Th2 differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 3880-3885.

- Cretney, E., Xin, A., Shi, W., Minnich, M., Masson, F., Miasari, M., Belz, G.T., Smyth, G.K., Busslinger, M., Nutt, S.L., and Kallies, A. (2011). The transcription factors Blimp-1 and IRF4 jointly control the differentiation and function of effector regulatory T cells. *Nature immunology* 12, 304-311.
- Croft, M., Carter, L., Swain, S.L., and Dutton, R.W. (1994). Generation of polarized antigen-specific CD8 effector populations: reciprocal action of interleukin (IL)-4 and IL-12 in promoting type 2 versus type 1 cytokine profiles. *J Exp Med* 180, 1715-1728.
- Cua, D.J., Sherlock, J., Chen, Y., Murphy, C.A., Joyce, B., Seymour, B., Lucian, L., To, W., Kwan, S., Churakova, T., *et al.* (2003). Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 421, 744-748.
- Dardalhon, V., Awasthi, A., Kwon, H., Galileos, G., Gao, W., Sobel, R.A., Mitsdoerffer, M., Strom, T.B., Elyaman, W., Ho, I.C., *et al.* (2008). IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3⁺ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9⁺ IL-10⁺ Foxp3(-) effector T cells. *Nat.Immunol.* 9, 1347-1355.
- Derynck, R., and Zhang, Y.E. (2003). Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 425, 577-584.
- Dong, Q., Louahed, J., Vink, A., Sullivan, C.D., Messler, C.J., Zhou, Y., Haczku, A., Huaux, F., Arras, M., Holroyd, K.J., *et al.* (1999). IL-9 induces chemokine expression in lung epithelial cells and baseline airway eosinophilia in transgenic mice. *European journal of immunology* 29, 2130-2139.
- Doull, I.J., Lawrence, S., Watson, M., Begishvili, T., Beasley, R.W., Lampe, F., Holgate, T., and Morton, N.E. (1996). Allelic association of gene markers on chromosomes 5q and 11q with atopy and bronchial hyperresponsiveness. *American journal of respiratory and critical care medicine* 153, 1280-1284.
- Duerr, R.H., Taylor, K.D., Brant, S.R., Rioux, J.D., Silverberg, M.S., Daly, M.J., Steinhart, A.H., Abraham, C., Regueiro, M., Griffiths, A., *et al.* (2006). A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* 314, 1461-1463.
- Eguchi, J., Wang, X., Yu, S., Kershaw, E.E., Chiu, P.C., Dushay, J., Estall, J.L., Klein, U., Maratos-Flier, E., and Rosen, E.D. (2011). Transcriptional control of adipose lipid handling by IRF4. *Cell metabolism* 13, 249-259.
- Eguchi, J., Yan, Q.W., Schones, D.E., Kamal, M., Hsu, C.H., Zhang, M.Q., Crawford, G.E., and Rosen, E.D. (2008). Interferon regulatory factors are transcriptional regulators of adipogenesis. *Cell metabolism* 7, 86-94.
- Eisenbeis, C.F., Singh, H., and Storb, U. (1995). Pip, a Novel Irf Family Member, Is a Lymphoid-Specific, Pu.1-Dependent Transcriptional Activator. *Gene Dev* 9, 1377-1387.
- Eklund, K.K., Ghildyal, N., Austen, K.F., and Stevens, R.L. (1993). Induction by IL-9 and suppression by IL-3 and IL-4 of the levels of chromosome 14-derived transcripts that encode late-expressed mouse mast cell proteases. *Journal of immunology* 151, 4266-4273.

- El-Behi, M., Ciric, B., Dai, H., Yan, Y., Cullimore, M., Safavi, F., Zhang, G.X., Dittel, B.N., and Rostami, A. (2011). The encephalitogenicity of T(H)17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF. *Nature immunology* 12, 568-575.
- Escalante, C.R., Brass, A.L., Pongubala, J.M., Shatova, E., Shen, L., Singh, H., and Aggarwal, A.K. (2002a). Crystal structure of PU.1/IRF-4/DNA ternary complex. *Molecular cell* 10, 1097-1105.
- Escalante, C.R., Shen, L., Escalante, M.C., Brass, A.L., Edwards, T.A., Singh, H., and Aggarwal, A.K. (2002b). Crystallization and characterization of PU.1/IRF-4/DNA ternary complex. *Journal of structural biology* 139, 55-59.
- Fletcher, J.M., Lalor, S.J., Sweeney, C.M., Tubridy, N., and Mills, K.H. (2010). T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clinical and experimental immunology* 162, 1-11.
- Fontenot, J.D., Gavin, M.A., and Rudensky, A.Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nature immunology* 4, 330-336.
- Fu, X.Y., Kessler, D.S., Veals, S.A., Levy, D.E., and Darnell, J.E., Jr. (1990). ISGF3, the transcriptional activator induced by interferon alpha, consists of multiple interacting polypeptide chains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 8555-8559.
- Fujino, S., Andoh, A., Bamba, S., Ogawa, A., Hata, K., Araki, Y., Bamba, T., and Fujiyama, Y. (2003). Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* 52, 65-70.
- Gerlach, K., Hwang, Y., Nikolaev, A., Atreya, R., Dornhoff, H., Steiner, S., Lehr, H.A., Wirtz, S., Vieth, M., Waisman, A., *et al.* (2014). TH9 cells that express the transcription factor PU.1 drive T cell-mediated colitis via IL-9 receptor signaling in intestinal epithelial cells. *Nat Immunol* 15, 676-686.
- Glasmacher, E., Agrawal, S., Chang, A.B., Murphy, T.L., Zeng, W., Vander Lugt, B., Khan, A.A., Ciofani, M., Spooner, C.J., Rutz, S., *et al.* (2012). A genomic regulatory element that directs assembly and function of immune-specific AP-1-IRF complexes. *Science* 338, 975-980.
- Goenka, S., and Kaplan, M.H. (2011). Transcriptional regulation by STAT6. *Immunol Res* 50, 87-96.
- Goswami, R., Jabeen, R., Yagi, R., Pham, D., Zhu, J., Goenka, S., and Kaplan, M.H. (2012). STAT6-dependent regulation of Th9 development. *J Immunol* 188, 968-975.
- Grossman, A., Mittrucker, H.W., Nicholl, J., Suzuki, A., Chung, S., Antonio, L., Suggs, S., Sutherland, G.R., Siderovski, D.P., and Mak, T.W. (1996). Cloning of human lymphocyte-specific interferon regulatory factor (hLSIRF/hIRF4) and mapping of the gene to 6p23-p25. *Genomics* 37, 229-233.
- Guichard, C., Amaddeo, G., Imbeaud, S., Ladeiro, Y., Pelletier, L., Ben Maad, I., Calderaro, J., Bioulac-Sage, P., Letexier, M., Degos, F., *et al.* (2012). Integrated analysis of somatic mutations

and focal copy-number changes identifies key genes and pathways in hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* 44, 694-U120.

Guo, L., Wei, G., Zhu, J., Liao, W., Leonard, W.J., Zhao, K., and Paul, W. (2009). IL-1 family members and STAT activators induce cytokine production by Th2, Th17, and Th1 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 13463-13468.

Gupta, S., Jiang, M., Anthony, A., and Pernis, A.B. (1999). Lineage-specific modulation of interleukin 4 signaling by interferon regulatory factor 4. *J Exp Med* 190, 1837-1848.

Heinrich, P.C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H.M., Muller-Newen, G., and Schaper, F. (2003). Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem.J.* 374, 1-20.

Heller, F., Florian, P., Bojarski, C., Richter, J., Christ, M., Hillenbrand, B., Mankertz, J., Gitter, A.H., Burgel, N., Fromm, M., *et al.* (2005). Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology* 129, 550-564.

Hellings, P.W., Kasran, A., Liu, Z.J., Vandekerckhove, P., Wuyts, A., Overbergh, L., Mathieu, C., and Ceuppens, J.L. (2003). Interleukin-17 orchestrates the granulocyte influx into airways after allergen inhalation in a mouse model of allergic asthma. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 28, 42-50.

Hemdan, N.Y., Birkenmeier, G., Wichmann, G., Abu El-Saad, A.M., Krieger, T., Conrad, K., and Sack, U. (2010). Interleukin-17-producing T helper cells in autoimmunity. *Autoimmunity reviews* 9, 785-792.

Hess, J., Angel, P., and Schorpp-Kistner, M. (2004). AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *Journal of cell science* 117, 5965-5973.

Ho, I.C., Hodge, M.R., Rooney, J.W., and Glimcher, L.H. (1996). The proto-oncogene c-maf is responsible for tissue-specific expression of interleukin-4. *Cell* 85, 973-983.

Hodge, D.R., Hurt, E.M., and Farrar, W.L. (2005). The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer. *European journal of cancer* 41, 2502-2512.

Holttä, V., Klemetti, P., Sipponen, T., Westerholm-Ormio, M., Kociubinski, G., Salo, H., Rasanen, L., Kolho, K.L., Farkkila, M., Savilahti, E., and Vaarala, O. (2008). IL-23/IL-17 immunity as a hallmark of Crohn's disease. *Inflammatory bowel diseases* 14, 1175-1184.

Huber, M., Brustle, A., Reinhard, K., Guralnik, A., Walter, G., Mahiny, A., von, L.E., and Lohoff, M. (2008). IRF4 is essential for IL-21-mediated induction, amplification, and stabilization of the Th17 phenotype. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 105, 20846-20851.

Huber, M., Heink, S., Pagenstecher, A., Reinhard, K., Ritter, J., Visekruna, A., Guralnik, A., Bollig, N., Jeltsch, K., Heinemann, C., *et al.* (2013). IL-17A secretion by CD8⁺ T cells supports Th17-mediated autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest* 123, 247-260.

- Huber, M., and Lohoff, M. (2014). IRF4 at the crossroads of effector T-cell fate decision. *European journal of immunology*.
- Hufford, M.M., and Kaplan, M.H. (2014). A gut reaction to IL-9. *Nature immunology* *15*, 599-600.
- Hwang, E.S., Szabo, S.J., Schwartzberg, P.L., and Glimcher, L.H. (2005). T helper cell fate specified by kinase-mediated interaction of T-bet with GATA-3. *Science* *307*, 430-433.
- Ichiyama, K., Yoshida, H., Wakabayashi, Y., Chinen, T., Saeki, K., Nakaya, M., Takaesu, G., Hori, S., Yoshimura, A., and Kobayashi, T. (2008). Foxp3 inhibits RORgammat-mediated IL-17A mRNA transcription through direct interaction with RORgammat. *The Journal of biological chemistry* *283*, 17003-17008.
- Iida, S., Rao, P.H., Butler, M., Corradini, P., Boccadoro, M., Klein, B., Chaganti, R.S., and Dalla-Favera, R. (1997). Deregulation of MUM1/IRF4 by chromosomal translocation in multiple myeloma. *Nature genetics* *17*, 226-230.
- Ito, M., Iida, S., Inagaki, H., Tsuboi, K., Komatsu, H., Yamaguchi, M., Nakamura, N., Suzuki, R., Seto, M., Nakamura, S., *et al.* (2002). MUM1/IRF4 expression is an unfavorable prognostic factor in B-Cell chronic lymphocytic leukemia (CLL)/small lymphocytic lymphoma (SLL). *Jpn J Cancer Res* *93*, 685-694.
- Ivanov, I.I., McKenzie, B.S., Zhou, L., Tadokoro, C.E., Lepelley, A., Lafaille, J.J., Cua, D.J., and Littman, D.R. (2006). The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17⁺ T helper cells. *Cell* *126*, 1121-1133.
- Jabeen, R., Goswami, R., Awe, O., Kulkarni, A., Nguyen, E.T., Attenasio, A., Walsh, D., Olson, M.R., Kim, M.H., Tepper, R.S., *et al.* (2013). Th9 cell development requires a BATF-regulated transcriptional network. *The Journal of clinical investigation* *123*, 4641-4653.
- Jager, A., Dardalhon, V., Sobel, R.A., Bettelli, E., and Kuchroo, V.K. (2009). Th1, Th17, and Th9 effector cells induce experimental autoimmune encephalomyelitis with different pathological phenotypes. *Journal of immunology* *183*, 7169-7177.
- Jenner, R.G., Townsend, M.J., Jackson, I., Sun, K., Bouwman, R.D., Young, R.A., Glimcher, L.H., and Lord, G.M. (2009). The transcription factors T-bet and GATA-3 control alternative pathways of T-cell differentiation through a shared set of target genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *106*, 17876-17881.
- Jo, S.H., and Ren, R. (2012). IRF-4 suppresses BCR/ABL transformation of myeloid cells in a DNA binding-independent manner. *The Journal of biological chemistry* *287*, 1770-1778.
- Johnson, K., Hashimshony, T., Sawai, C.M., Pongubala, J.M., Skok, J.A., Aifantis, I., and Singh, H. (2008). Regulation of immunoglobulin light-chain recombination by the transcription factor IRF-4 and the attenuation of interleukin-7 signaling. *Immunity* *28*, 335-345.
- Kaech, S.M., and Cui, W.G. (2012). Transcriptional control of effector and memory CD8(+) T cell differentiation. *Nature Reviews Immunology* *12*, 749-761.

- Kaplan, M.H., Schindler, U., Smiley, S.T., and Grusby, M.J. (1996). Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for the development of Th2 cells. *Immunity* 4, 313-319.
- Kebir, H., Kreymborg, K., Ifergan, I., Dodelet-Devillers, A., Cayrol, R., Bernard, M., Giuliani, F., Arbour, N., Becher, B., and Prat, A. (2007). Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nature medicine* 13, 1173-1175.
- Kim, P.K., Armstrong, M., Liu, Y., Yan, P., Bucher, B., Zuckerbraun, B.S., Gambotto, A., Billiar, T.R., and Yim, J.H. (2004). IRF-1 expression induces apoptosis and inhibits tumor growth in mouse mammary cancer cells in vitro and in vivo. *Oncogene* 23, 1125-1135.
- Kim, T.K., Lee, J.S., Jung, J.E., Oh, S.Y., Kwak, S., Jin, X., Lee, S.Y., Lee, J.B., Chung, Y.G., Choi, Y.K., *et al.* (2006). Interferon regulatory factor 3 activates p53-dependent cell growth inhibition. *Cancer letters* 242, 215-221.
- Kishimoto, T. (1989). The biology of interleukin-6. *Blood* 74, 1-10.
- Klein, U., Casola, S., Cattoretti, G., Shen, Q., Lia, M., Mo, T., Ludwig, T., Rajewsky, K., and Dalla-Favera, R. (2006). Transcription factor IRF4 controls plasma cell differentiation and class-switch recombination. *Nature immunology* 7, 773-782.
- Kobayashi, T., Iijima, K., Checkel, J.L., and Kita, H. (2013). IL-1 Family Cytokines Drive Th2 and Th17 Cells to Innocuous Airborne Antigens. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 49, 989-998.
- Kouro, T., and Takatsu, K. (2009). IL-5- and eosinophil-mediated inflammation: from discovery to therapy. *International immunology* 21, 1303-1309.
- Kurachi, M., Barnitz, R.A., Yosef, N., Odorizzi, P.M., DiIorio, M.A., Lemieux, M.E., Yates, K., Godec, J., Klatt, M.G., Regev, A., *et al.* (2014). The transcription factor BATF operates as an essential differentiation checkpoint in early effector CD8(+) T cells. *Nature immunology* 15, 373-+.
- Langrish, C.L., Chen, Y., Blumenschein, W.M., Mattson, J., Basham, B., Sedgwick, J.D., McClanahan, T., Kastelein, R.A., and Cua, D.J. (2005). IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *Journal of Experimental Medicine* 201, 233-240.
- Lazarevic, V., Chen, X., Shim, J.H., Hwang, E.S., Jang, E., Bolm, A.N., Oukka, M., Kuchroo, V.K., and Glimcher, L.H. (2011). T-bet represses T(H)17 differentiation by preventing Runx1-mediated activation of the gene encoding ROR gamma t. *Nature immunology* 12, 96-U124.
- Le Gros, G., Ben-Sasson, S.Z., Seder, R., Finkelman, F.D., and Paul, W.E. (1990). Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells. *The Journal of experimental medicine* 172, 921-929.
- Lech, M., Weidenbusch, M., Kulkarni, O.P., Ryu, M., Darisipudi, M.N., Susanti, H.E., Mittrucker, H.W., Mak, T.W., and Anders, H.J. (2011). IRF4 Deficiency Abrogates Lupus Nephritis Despite Enhancing Systemic Cytokine Production. *Journal of the American Society of Nephrology* 22, 1443-1452.

- Lee, A.Y.S., Eri, R., Lyons, A.B., Grimm, M.C., and Korner, H. (2013). CC chemokine ligand 20 and its cognate receptor CCR6 in mucosal T cell immunology and inflammatory bowel disease: odd couple or axis of evil? *Front Immunol* 4.
- Lee, Y., Awasthi, A., Yosef, N., Quintana, F.J., Xiao, S., Peters, A., Wu, C., Kleinewietfeld, M., Kunder, S., Hafler, D.A., *et al.* (2012). Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells. *Nature immunology* 13, 991-999.
- Lehtonen, A., Veckman, V., Nikula, T., Lahesmaa, R., Kinnunen, L., Matikainen, S., and Julkunen, I. (2005). Differential expression of IFN regulatory factor 4 gene in human monocyte-derived dendritic cells and macrophages. *Journal of immunology* 175, 6570-6579.
- Leppkes, M., Becker, C., Ivanov, II, Hirth, S., Wirtz, S., Neufert, C., Pouly, S., Murphy, A.J., Valenzuela, D.M., Yancopoulos, G.D., *et al.* (2009). RORgamma-expressing Th17 cells induce murine chronic intestinal inflammation via redundant effects of IL-17A and IL-17F. *Gastroenterology* 136, 257-267.
- Lew, A.M., Pardoll, D.M., Maloy, W.L., Fowlkes, B.J., Kruisbeek, A., Cheng, S.F., Germain, R.N., Bluestone, J.A., Schwartz, R.H., and Coligan, J.E. (1986). Characterization of T cell receptor gamma chain expression in a subset of murine thymocytes. *Science* 234, 1401-1405.
- Li, H., Nourbakhsh, B., Ciric, B., Zhang, G.X., and Rostami, A. (2010). Neutralization of IL-9 ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis by decreasing the effector T cell population. *Journal of immunology* 185, 4095-4100.
- Li, H., Nourbakhsh, B., Cullimore, M., Zhang, G.X., and Rostami, A. (2011). IL-9 is important for T-cell activation and differentiation in autoimmune inflammation of the central nervous system. *European journal of immunology* 41, 2197-2206.
- Li, P., Spolski, R., Liao, W., Wang, L., Murphy, T.L., Murphy, K.M., and Leonard, W.J. (2012). BATF-JUN is critical for IRF4-mediated transcription in T cells. *Nature* 490, 543-+.
- Liao, W., Spolski, R., Li, P., Du, N., West, E.E., Ren, M., Mitra, S., and Leonard, W.J. (2014). Opposing actions of IL-2 and IL-21 on Th9 differentiation correlate with their differential regulation of BCL6 expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, 3508-3513.
- Lohoff, M., and Mak, T.W. (2005). Roles of interferon-regulatory factors in T-helper-cell differentiation. *Nature Reviews Immunology* 5, 125-135.
- Lohoff, M., Mittrucker, H.W., Prechtel, S., Bischof, S., Sommer, F., Kock, S., Ferrick, D.A., Duncan, G.S., Gessner, A., and Mak, T.W. (2002). Dysregulated T helper cell differentiation in the absence of interferon regulatory factor 4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 11808-11812.
- Lu, R., Medina, K.L., Lancki, D.W., and Singh, H. (2003). IRF-4,8 orchestrate the pre-B-to-B transition in lymphocyte development. *Genes Dev* 17, 1703-1708.
- Lu, R.Q. (2008). Interferon regulatory factor 4 and 8 in B-cell development. *Trends Immunol* 29, 487-492.

- Luker, K.E., Pica, C.M., Schreiber, R.D., and Piwnica-Worms, D. (2001). Overexpression of IRF9 confers resistance to antimicrotubule agents in breast cancer cells. *Cancer research* 61, 6540-6547.
- Makarova, O., Kamberov, E., and Margolis, B. (2000). Generation of deletion and point mutations with one primer in a single cloning step. *Biotechniques* 29, 970-972.
- Mamane, Y., Heylbroeck, C., Genin, P., Algarte, M., Servant, M.J., LePage, C., DeLuca, C., Kwon, H., Lin, R., and Hiscott, J. (1999). Interferon regulatory factors: the next generation. *Gene* 237, 1-14.
- Mamane, Y., Sharma, S., Petropoulos, L., Lin, R., and Hiscott, J. (2000). Posttranslational regulation of IRF-4 activity by the immunophilin FKBP52. *Immunity* 12, 129-140.
- Man, K., Miasari, M., Shi, W., Xin, A., Henstridge, D.C., Preston, S., Pellegrini, M., Belz, G.T., Smyth, G.K., Febbraio, M.A., *et al.* (2013). The transcription factor IRF4 is essential for TCR affinity-mediated metabolic programming and clonal expansion of T cells. *Nature immunology* 14, 1155-1165.
- Mangan, P.R., Harrington, L.E., O'Quinn, D.B., Helms, W.S., Bullard, D.C., Elson, C.O., Hatton, R.D., Wahl, S.M., Schoeb, T.R., and Weaver, C.T. (2006). Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 441, 231-234.
- Marecki, S., and Fenton, M.J. (2002). The role of IRF-4 in transcriptional regulation. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 22, 121-133.
- Matsuyama, T., Grossman, A., Mittrucker, H.W., Siderovski, D.P., Kiefer, F., Kawakami, T., Richardson, C.D., Taniguchi, T., Yoshinaga, S.K., and Mak, T.W. (1995). Molecular-Cloning of Lsirr, a Lymphoid-Specific Member of the Interferon Regulatory Factor Family That Binds the Interferon-Stimulated Response Element (Isre). *Nucleic acids research* 23, 2127-2136.
- Mittrucker, H.W., Matsuyama, T., Grossman, A., Kundig, T.M., Potter, J., Shahinian, A., Wakeham, A., Patterson, B., Ohashi, P.S., and Mak, T.W. (1997). Requirement for the transcription factor LSIRF/IRF4 for mature B and T lymphocyte function. *Science* 275, 540-543.
- Miyamoto, M., Fujita, T., Kimura, Y., Maruyama, M., Harada, H., Sudo, Y., Miyata, T., and Taniguchi, T. (1988). Regulated Expression of a Gene Encoding a Nuclear Factor, Irf-1, That Specifically Binds to Ifn-Beta-Gene Regulatory Elements. *Cell* 54, 903-913.
- Mosmann, T.R., and Coffman, R.L. (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annual review of immunology* 7, 145-173.
- Mudter, J., Yu, J.L., Zufferey, C., Brustle, A., Wirtz, S., Weigmann, B., Hoffman, A., Schenk, M., Galle, P.R., Lehr, H.A., *et al.* (2011). IRF4 Regulates IL-17A Promoter Activity and Controls ROR gamma t-dependent Th17 Colitis In Vivo. *Inflammatory bowel diseases* 17, 1343-1358.

Murugaiyan, G., Beynon, V., Da Cunha, A.P., Joller, N., and Weiner, H.L. (2012). IFN-gamma Limits Th9-Mediated Autoimmune Inflammation through Dendritic Cell Modulation of IL-27. *Journal of immunology* 189, 5277-5283.

Nagelkerken, L. (1998). Role of Th1 and Th2 cells in autoimmune demyelinating disease. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica ... [et al.]* 31, 55-60.

Nakanishi, K., Matsui, K., Kashiwamura, S., Nishioka, Y., Nomura, J., Nishimura, Y., Sakaguchi, N., Yonehara, S., Higashino, K., and Shinka, S. (1996). IL-4 and anti-CD40 protect against Fas-mediated B cell apoptosis and induce B cell growth and differentiation. *International immunology* 8, 791-798.

Natkunam, Y., Warnke, R.A., Montgomery, K., Falini, B., and van De Rijn, M. (2001). Analysis of MUM1/IRF4 protein expression using tissue microarrays and immunohistochemistry. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 14, 686-694.

Nelms, K., Keegan, A.D., Zamorano, J., Ryan, J.J., and Paul, W.E. (1999). The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Annual review of immunology* 17, 701-738.

Okamoto, K., Iwai, Y., Oh-Hora, M., Yamamoto, M., Morio, T., Aoki, K., Ohya, K., Jetten, A.M., Akira, S., Muta, T., and Takayanagi, H. (2010). IkappaBzeta regulates T(H)17 development by cooperating with ROR nuclear receptors. *Nature* 464, 1381-1385.

Ortmann, C.A., Burchert, A., Holzle, K., Nitsche, A., Wittig, B., Neubauer, A., and Schmidt, M. (2005). Down-regulation of interferon regulatory factor 4 gene expression in leukemic cells due to hypermethylation of CpG motifs in the promoter region. *Nucleic acids research* 33, 6895-6905.

Ouyang, W.J., Lohning, M., Gao, Z.G., Assenmacher, M., Ranganath, S., Radbruch, A., and Murphy, K.M. (2000). Stat6-independent GATA-3 autoactivation directs IL-4-independent Th2 development and commitment. *Immunity* 12, 27-37.

Ouyang, X., Zhang, R., Yang, J., Li, Q., Qin, L., Zhu, C., Liu, J., Ning, H., Shin, M.S., Gupta, M., *et al.* (2011). Transcription factor IRF8 directs a silencing programme for TH17 cell differentiation. *Nat Commun* 2, 314.

Panitch, H.S., Hirsch, R.L., Haley, A.S., and Johnson, K.P. (1987). Exacerbations of multiple sclerosis in patients treated with gamma interferon. *Lancet* 1, 893-895.

Pawankar, R., Okuda, M., Yssel, H., Okumura, K., and Ra, C. (1997). Nasal mast cells in perennial allergic rhinitis exhibit increased expression of the Fc epsilonRI, CD40L, IL-4, and IL-13, and can induce IgE synthesis in B cells. *The Journal of clinical investigation* 99, 1492-1499.

Petit-Frere, C., Dugas, B., Braquet, P., and Mencia-Huerta, J.M. (1993). Interleukin-9 potentiates the interleukin-4-induced IgE and IgG1 release from murine B lymphocytes. *Immunology* 79, 146-151.

- Piela, L., Nemethy, G., and Scheraga, H.A. (1987). Conformational constraints of amino acid side chains in alpha-helices. *Biopolymers* 26, 1273-1286.
- Pimenta, E.M., De, S., Weiss, R., Feng, D., Hall, K., Kilic, S., Bhanot, G., Ganesan, S., Ran, S., and Barnes, B.J. (2015). IRF5 is a novel regulator of CXCL13 expression in breast cancer that regulates CXCR5(+) B- and T-cell trafficking to tumor-conditioned media. *Immunol Cell Biol* 93, 486-499.
- Praetorius, C., Grill, C., Stacey, S.N., Metcalf, A.M., Gorkin, D.U., Robinson, K.C., Van Otterloo, E., Kim, R.S., Bergsteinsdottir, K., Ogmundsdottir, M.H., *et al.* (2013). A polymorphism in IRF4 affects human pigmentation through a tyrosinase-dependent MITF/TFAP2A pathway. *Cell* 155, 1022-1033.
- Rackowski, F., Ritter, J., Heesch, K., Schumacher, V., Guralnik, A., Hocker, L., Raifer, H., Klein, M., Bopp, T., Harb, H., *et al.* (2013). The transcription factor Interferon Regulatory Factor 4 is required for the generation of protective effector CD8(+) T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 15019-15024.
- Remesh, S.G., Santosh, V., and Escalante, C.R. (2015). Structural Studies of IRF4 Reveal a Flexible Autoinhibitory Region and a Compact Linker Domain. *The Journal of biological chemistry* 290, 27779-27790.
- Rengarajan, J., Mowen, K.A., McBride, K.D., Smith, E.D., Singh, H., and Glimcher, L.H. (2002). Interferon regulatory factor 4 (IRF4) interacts with NFATc2 to modulate interleukin 4 gene expression. *The Journal of experimental medicine* 195, 1003-1012.
- Roberts, M.J., Chadburn, A., Ma, S., Hyjek, E., and Peterson, L.C. (2013). Nuclear protein dysregulation in lymphoplasmacytic lymphoma/waldenstrom macroglobulinemia. *American journal of clinical pathology* 139, 210-219.
- Rooney, J.W., Hoey, T., and Glimcher, L.H. (1995). Coordinate and Cooperative Roles for Nf-at and Ap-1 in the Regulation of the Murine Il-4 Gene. *Immunity* 2, 473-483.
- Rostami, A., and Ciric, B. (2013). Role of Th17 cells in the pathogenesis of CNS inflammatory demyelination. *Journal of the neurological sciences* 333, 76-87.
- Schmidt, M., Hochhaus, A., Konig-Merediz, S.A., Brendel, C., Proba, J., Hoppe, G.J., Wittig, B., Ehninger, G., Hehlmann, R., and Neubauer, A. (2000). Expression of interferon regulatory factor 4 in chronic myeloid leukemia: Correlation with response to interferon alfa therapy. *Journal of Clinical Oncology* 18, 3331-3338.
- Schmitt, E., Germann, T., Goedert, S., Hoehn, P., Huels, C., Koelsch, S., Kuhn, R., Muller, W., Palm, N., and Rude, E. (1994). IL-9 production of naive CD4+ T cells depends on IL-2, is synergistically enhanced by a combination of TGF-beta and IL-4, and is inhibited by IFN-gamma. *Journal of immunology* 153, 3989-3996.
- Schraml, B.U., Hildner, K., Ise, W., Lee, W.L., Smith, W.A., Solomon, B., Sahota, G., Sim, J., Mukasa, R., Cemurski, S., *et al.* (2009). The AP-1 transcription factor Batf controls T(H)17 differentiation. *Nature* 460, 405-409.

- Sciammas, R., Shaffer, A.L., Schatz, J.H., Zhao, H., Staudt, L.M., and Singh, H. (2006). Graded expression of interferon regulatory factor-4 coordinates isotype switching with plasma cell differentiation. *Immunity* 25, 225-236.
- Seder, R.A., Gazzinelli, R., Sher, A., and Paul, W.E. (1993). Interleukin-12 Acts Directly on Cd4⁺ T-Cells to Enhance Priming for Interferon-Gamma Production and Diminishes Interleukin-4 Inhibition of Such Priming. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 10188-10192.
- Simonetti, G., Carette, A., Silva, K., Wang, H., De Silva, N.S., Heise, N., Siebel, C.W., Shlomchik, M.J., and Klein, U. (2013). IRF4 controls the positioning of mature B cells in the lymphoid microenvironments by regulating NOTCH2 expression and activity. *The Journal of experimental medicine* 210, 2887-2902.
- Soroosh, P., and Doherty, T.A. (2009). Th9 and allergic disease. *Immunology* 127, 450-458.
- Stassen, M., Schmitt, E., and Bopp, T. (2012). From interleukin-9 to T helper 9 cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1247, 56-68.
- Staudt, V., Bothur, E., Klein, M., Lingnau, K., Reuter, S., Grebe, N., Gerlitzki, B., Hoffmann, M., Ulges, A., Taube, C., *et al.* (2010). Interferon-regulatory factor 4 is essential for the developmental program of T helper 9 cells. *Immunity*. 33, 192-202.
- Swain, S.L., Weinberg, A.D., English, M., and Huston, G. (1990). IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *Journal of immunology* 145, 3796-3806.
- Szabo, S.J., Kim, S.T., Costa, G.L., Zhang, X., Fathman, C.G., and Glimcher, L.H. (2000). A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 100, 655-669.
- Takeda, K., Tanaka, T., Shi, W., Matsumoto, M., Minami, M., Kashiwamura, S., Nakanishi, K., Yoshida, N., Kishimoto, T., and Akira, S. (1996). Essential role of Stat6 in IL-4 signalling. *Nature* 380, 627-630.
- Tamada, K., Harada, M., Abe, K., Li, T., and Nomoto, K. (1998). IL-4-producing NK1.1⁺ T cells are resistant to glucocorticoid-induced apoptosis: implications for the Th1/Th2 balance. *Journal of immunology* 161, 1239-1247.
- Tamiya, T., Ichiyama, K., Kotani, H., Fukaya, T., Sekiya, T., Shichita, T., Honma, K., Yui, K., Matsuyama, T., Nakao, T., *et al.* (2013). Smad2/3 and IRF4 Play a Cooperative Role in IL-9-Producing T Cell Induction. *Journal of immunology* 191, 2360-2371.
- Tan, C., Aziz, M.K., Lovaas, J.D., Vistica, B.P., Shi, G., Wawrousek, E.F., and Gery, I. (2010). Antigen-specific Th9 cells exhibit uniqueness in their kinetics of cytokine production and short retention at the inflammatory site. *J Immunol* 185, 6795-6801.
- Tanigaki, K., Tsuji, M., Yamamoto, N., Han, H., Tsukada, J., Inoue, H., Kubo, M., and Honjo, T. (2004). Regulation of alphabeta/gammadelta T cell lineage commitment and peripheral T cell responses by Notch/RBP-J signaling. *Immunity* 20, 611-622.

Taniguchi, T., Ogasawara, K., Takaoka, A., and Tanaka, N. (2001). IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annual review of immunology* 19, 623-655.

Temann, U.A., Geba, G.P., Rankin, J.A., and Flavell, R.A. (1998). Expression of interleukin 9 in the lungs of transgenic mice causes airway inflammation, mast cell hyperplasia, and bronchial hyperresponsiveness. *The Journal of experimental medicine* 188, 1307-1320.

Thierfelder, W.E., van Deursen, J.M., Yamamoto, K., Tripp, R.A., Sarawar, S.R., Carson, R.T., Sangster, M.Y., Vignali, D.A., Doherty, P.C., Grosveld, G.C., and Ihle, J.N. (1996). Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells. *Nature* 382, 171-174.

Thieu, V.T., Yu, Q., Chang, H.C., Yeh, N., Nguyen, E.T., Sehra, S., and Kaplan, M.H. (2008). Signal Transducer and Activator of Transcription 4 Is Required for the Transcription Factor T-bet to Promote T Helper 1 Cell-Fate Determination. *Immunity* 29, 679-690.

Tsuboi, K., Iida, S., Inagaki, H., Kato, M., Hayami, Y., Hanamura, I., Miura, K., Harada, S., Kikuchi, M., Komatsu, H., *et al.* (2000). MUM1/IRF4 expression as a frequent event in mature lymphoid malignancies. *Leukemia* 14, 449-456.

Tussiwand, R., Lee, W.L., Murphy, T.L., Mashayekhi, M., Kc, W., Albring, J.C., Satpathy, A.T., Rotondo, J.A., Edelson, B.T., Kretzer, N.M., *et al.* (2012). Compensatory dendritic cell development mediated by BATF-IRF interactions. *Nature* 490, 502-507.

Ubel, C., Graser, A., Koch, S., Rieker, R.J., Lehr, H.A., Muller, M., and Finotto, S. (2014). Role of Tyk-2 in Th9 and Th17 cells in allergic asthma. *Scientific reports* 4, 5865.

Vander Lugt, B., Khan, A.A., Hackney, J.A., Agrawal, S., Lesch, J., Zhou, M., Lee, W.P., Park, S., Xu, M., DeVoss, J., *et al.* (2014). Transcriptional programming of dendritic cells for enhanced MHC class II antigen presentation. *Nat Immunol* 15, 161-167.

Vasanthakumar, A., Moro, K., Xin, A., Liao, Y., Gloury, R., Kawamoto, S., Fagarasan, S., Mielke, L.A., Afshar-Sterle, S., Masters, S.L., *et al.* (2015). The transcriptional regulators IRF4, BATF and IL-33 orchestrate development and maintenance of adipose tissue-resident regulatory T cells. *Nat Immunol* 16, 276-285.

Veldhoen, M., Hirota, K., Westendorf, A.M., Buer, J., Dumoutier, L., Renauld, J.C., and Stockinger, B. (2008a). The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature* 453, 106-109.

Veldhoen, M., Hocking, R.J., Atkins, C.J., Locksley, R.M., and Stockinger, B. (2006). TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 24, 179-189.

Veldhoen, M., Uyttenhove, C., van, S.J., Helmby, H., Westendorf, A., Buer, J., Martin, B., Wilhelm, C., and Stockinger, B. (2008b). Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat.Immunol.* 9, 1341-1346.

Vissekruna, A., Ritter, J., Scholz, T., Campos, L., Guralnik, A., Poncette, L., Raifer, H., Hagner, S., Garn, H., Staudt, V., *et al.* (2013). Tc9 cells, a new subset of CD8(+) T cells, support Th2-mediated airway inflammation. *European journal of immunology* 43, 606-618.

Waight, J.D., Banik, D., Griffiths, E.A., Nemeth, M.J., and Abrams, S.I. (2014). Regulation of the Interferon regulatory factor-8 (IRF-8) Tumor Suppressor Gene by the Signal Transducer and Activator of Transcription 5 (STAT5) Transcription Factor in Chronic Myeloid Leukemia. *Journal of Biological Chemistry* 289, 15642-15652.

Wang, A.B., Pan, D., Lee, Y.H., Martinez, G.J., Feng, X.H., and Dong, C. (2013). Cutting Edge: Smad2 and Smad4 Regulate TGF-beta-Mediated Il9 Gene Expression via EZH2 Displacement. *Journal of immunology* 191, 4908-4912.

Wang, C., Kang, S.G., Lee, J., Sun, Z., and Kim, C.H. (2009). The roles of CCR6 in migration of Th17 cells and regulation of effector T-cell balance in the gut. *Mucosal Immunol* 2, 173-183.

Wei, L., Laurence, A., Elias, K.M., and O'Shea, J.J. (2007). IL-21 is produced by Th17 cells and drives IL-17 production in a STAT3-dependent manner. *Journal of Biological Chemistry* 282, 34605-34610.

Weisz, A., Marx, P., Sharf, R., Appella, E., Driggers, P.H., Ozato, K., and Levi, B.Z. (1992). Human Interferon Consensus Sequence Binding-Protein Is a Negative Regulator of Enhancer Elements Common to Interferon-Inducible Genes. *Journal of Biological Chemistry* 267, 25589-25596.

Wills-Karp, M. (2004). Interleukin-13 in asthma pathogenesis. *Immunological reviews* 202, 175-190.

Wills-Karp, M., Luyimbazi, J., Xu, X., Schofield, B., Neben, T.Y., Karp, C.L., and Donaldson, D.D. (1998). Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science* 282, 2258-2261.

Witthuhn, B.A., Silvennoinen, O., Miura, O., Lai, K.S., Cwik, C., Liu, E.T., and Ihle, J.N. (1994). Involvement of the Jak-3 Janus kinase in signalling by interleukins 2 and 4 in lymphoid and myeloid cells. *Nature* 370, 153-157.

Wurster, A.L., Rodgers, V.L., White, M.F., Rothstein, T.L., and Grusby, M.J. (2002). Interleukin-4-mediated protection of primary B cells from apoptosis through Stat6-dependent up-regulation of Bcl-xL. *The Journal of biological chemistry* 277, 27169-27175.

Yagi, R., Zhu, J., and Paul, W.E. (2011). An updated view on transcription factor GATA3-mediated regulation of Th1 and Th2 cell differentiation. *International immunology* 23, 415-420.

Yamagata, T., Nishida, J., Tanaka, T., Sakai, R., Mitani, K., Yoshida, M., Taniguchi, T., Yazaki, Y., and Hirai, H. (1996). A novel interferon regulatory factor family transcription factor, ICSAT/Pip/LSIRF, that negatively regulates the activity of interferon-regulated genes. *Molecular and cellular biology* 16, 1283-1294.

Yamane, H., Zhu, J., and Paul, W.E. (2005). Independent roles for IL-2 and GATA-3 in stimulating naive CD4+ T cells to generate a Th2-inducing cytokine environment. *The Journal of experimental medicine* 202, 793-804.

- Yang, X.O., Zhang, H., Kim, B.S., Niu, X., Peng, J., Chen, Y., Kerketta, R., Lee, Y.H., Chang, S.H., Corry, D.B., *et al.* (2013). The signaling suppressor CIS controls proallergic T cell development and allergic airway inflammation. *Nature immunology* 14, 732-740.
- Yen, D., Cheung, J., Scheerens, H., Poulet, F., McClanahan, T., McKenzie, B., Kleinschek, M.A., Owyang, A., Mattson, J., Blumenschein, W., *et al.* (2006). IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *Journal of Clinical Investigation* 116, 1310-1316.
- Zhang, F.P., Meng, G.X., and Strober, W. (2008). Interactions among the transcription factors Runx1, ROR gamma t and Foxp3 regulate the differentiation of interleukin 17-producing T cells. *Nature immunology* 9, 1297-1306.
- Zhang, Z., Zheng, M., Bindas, J., Schwarzenberger, P., and Kolls, J.K. (2006). Critical role of IL-17 receptor signaling in acute TNBS-induced colitis. *Inflammatory bowel diseases* 12, 382-388.
- Zheng, W.P., and Flavell, R.A. (1997). The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 89, 587-596.
- Zheng, Y., Chaudhry, A., Kas, A., deRoos, P., Kim, J.M., Chu, T.T., Corcoran, L., Treuting, P., Klein, U., and Rudensky, A.Y. (2009). Regulatory T-cell suppressor program co-opts transcription factor IRF4 to control T(H)2 responses. *Nature* 458, 351-356.
- Zhou, L., Ivanov, I.I., Spolski, R., Min, R., Shenderov, K., Egawa, T., Levy, D.E., Leonard, W.J., and Littman, D.R. (2007). IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat.Immunol.*
- Zhou, L., Lopes, J.E., Chong, M.M., Ivanov, I.I., Min, R., Victora, G.D., Shen, Y., Du, J., Rubtsov, Y.P., Rudensky, A.Y., *et al.* (2008). TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgamma function. *Nature* 453, 236-240.
- Zhu, J., Cote-Sierra, J., Guo, L., and Paul, W.E. (2003). Stat5 activation plays a critical role in Th2 differentiation. *Immunity* 19, 739-748.
- Zielinski, C.E., Mele, F., Aschenbrenner, D., Jarrossay, D., Ronchi, F., Gattorno, M., Monticelli, S., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2012). Pathogen-induced human TH17 cells produce IFN-gamma or IL-10 and are regulated by IL-1beta. *Nature* 484, 514-518.

7 Publikationen

Bothur E, Raifer H, Haftmann C, Stittrich AB, Brüstle A, Brenner D, Bollig N, Bieringer M, Kang CH, Reinhard K, Camara B, Huber M, Visekruna A, Steinhoff U, Repenning A, Bauer UM, Sexl V, Radbruch A, Sparwasser T, Mashreghi MF, Wah Mak T, Lohoff M : Antigen receptor-mediated depletion of FOXP3 in induced regulatory T-lymphocytes via PTPN2 and FOXO1. Nat Commun. 2015 Oct 13;6:8576. doi: 10.1038/ncomms9576.

Abass E, Kang C, Martinkovic F, Semião-Santos SJ, Sundar S, Walden P, Piarroux R, El Harith A, Lohoff M, Steinhoff U : Heterogeneity of Leishmania donovani parasites complicates diagnosis of visceral leishmaniasis: comparison of different serological tests in three endemic regions. PLoS One. 2015 Mar 3;10(3):e0116408. doi: 10.1371/journal.pone.0116408. eCollection 2015

Kang CH, Hartmann E, Menke L, Thomas L, Camara B, Bieringer M and Lohoff M: A hyperactive IRF4 molecule. Manuscript in preparation.

8 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name, Vorname:	Cholho, KANG
Adresse:	Kwangbok-1 Dong, Nr 35. 2-6 Mangyongdae Stadtviertel, Pjöngjang. DVR der Korea
Geburtsdatum:	20.04.1981
Geburtsort:	Zentrum Stadtviertel, Pjöngjang
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	koreanisch

Ausbildung

1988-1992 :	„Kim IlSung" Grundschule
1992-1998 :	Gymnasium Nr. 1 in Pjöngjang
1998-2004 :	Pjöngjang Medizinische Hochschule der „Kim IlSung“ Universität

Berufstätigkeit und Promotion

2004- jetzt:	mikrobiologischer Arzt in der diagnostischen Abteilung der immunologischen und infektiösen Krankheiten, Rotes Kreuzkrankenhaus in Pjöngjang,
2011-2012:	Praktikant im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene an der Philipps-Universität Marburg
2013-2016	Doktorand im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene an der Philipps-Universität Marburg

Marburg, den 2016

Cholho Kang

9 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren folgende Damen/Herren
an der Pjöngjang Medizinischen Hochschule der „Kim IlSung“ Universität in Pjongjäng

Ho, Im, Jang, Jon, Kang, Kang, Kim, Kim, Kim, O, Pak, Ra, Ri, Ryom, Sin, Sim, So
und Yang

an der Philipps-Universität in Marburg

Huber, Lohoff, Steinhoff und Visekruna

10 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel “Struktur-Funktions-Analyse von IRF4 in der T-Zelldifferenzierung“ im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene unter Leitung von Prof. Dr. Med. Michael Lohoff mit Unterstützung durch die Stiftung „Hilfe zur Selbsthilfe“ und „Brot für die Welt-Evangelischer Entwicklungsdienst“ ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Marburg, den 30.4.2016

Cholho Kang

11 Danksagung

Ich möchte mich bei Prof. Dr. M. Lohoff für die Chance zuerst bedanken, diese Doktorarbeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene durchführen zu können und sowie für die exzellente Betreuung. Von Anfang meiner Ankunft bis jetzt hat er immer mit seiner Erfahrung mir nicht nur wissenschaftlich sondern auch persönlich geholfen.

Ich danke allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Lohoff, Steinhoff, Huber und Visekruna für die ständige Hilfsbereitschaft und die unzähligen Ratschläge.

Darüber hinaus möchte ich mich bei den ehemaligen Doktorandinnen und Doktoranden bedanken, mit denen ich viele Experimente zusammen gemacht habe und konstruktive Diskussionen geteilt habe.

Ein spezielles Dankeschön gilt meiner Familie und meiner Freundin, die während meiner Arbeit mich seelisch unterstützten und auf meinen Erfolg warteten.

Zum Schluss gebe ich schönen Gruß zu meiner Heimat, wo ich meine akademische Karriere angefangen habe und meine schöne Zukunft garantiert wird.